

**ZUR INAKTIVIERUNG VON
STAPHYLOKOKKENENTEROTOXIN B
MITTELS CHEMISCHER VERFAHREN**

Wolfram Helber

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0003

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München
Lehrstuhl Prof. Dr. G. Terplan

ZUR INAKTIVIERUNG VON STAPHYLOKOKKENENTEROTOXIN B
MITTELS CHEMISCHER VERFAHREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Wolfram Helber
aus
Schorndorf

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. A. Mayr



Tag der Promotion: 29. Juli 1977

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	2
2.1. Staphylokokkenenterotoxine	2
2.1.1. Allgemeine Eigenschaften	2
2.1.2. Spezielle Eigenschaften	4
2.2. Chemische Desinfektionswirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen	7
2.2.1. Alkalien	8
2.2.2. Schwermetalle	9
2.2.3. Peroxide	9
2.2.4. Halogene und Halogenverbindungen	10
2.2.5. Epoxide	11
2.2.6. Alkohole	12
2.2.7. Aldehyde	12
2.2.8. Säuren	13
2.2.9. Phenole	13
2.2.10. Oberflächenaktive Verbindungen	14
2.3. Der Einfluß von chemischen Desinfektionswirkstoffen auf Staphylokokkenenterotoxin B	16
2.4. Einfluß proteolytischer Enzyme auf Staphylokokkenenterotoxin B	20
3. Eigene Untersuchungen	22
3.1. Material	22
3.2. Methodik	24
3.2.1. Alkalien	25
3.2.2. Peroxide	25
3.2.3. Halogene	26
3.2.4. Alkohole	28

	Seite
3.2.5. Aldehyde	28
3.2.6. Säuren	29
3.2.7. Phenole	30
3.2.8. Oberflächenaktive Verbindungen	30
3.2.9. Proteolytische Enzyme	31
3.2.10. Nachweisverfahren	31
3.3. Ergebnisse	36
3.3.1. Alkalien	36
3.3.2. Peroxide	36
3.3.3. Halogene	38
3.3.4. Alkohole	40
3.3.5. Aldehyde	40
3.3.6. Säuren	40
3.3.7. Phenole	41
3.3.8. Oberflächenaktive Verbindungen	42
3.3.9. Proteolytische Enzyme	43
4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	55
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64

1. EINLEITUNG

Staphylokokkenintoxikationen rangieren in der Statistik an der Spitze bakterieller Lebensmittelvergiftungen. Mittels aufwendiger Verfahren wird das hochgereinigte Antigen, das zur Produktion spezifischer Antikörper im Hinblick auf den immunologischen Nachweis von Enterotoxin benötigt wird, aus Rohtoxin gewonnen. Dabei ist es nicht vermeidbar, daß Geräte, Behältnisse, Labormöbel und andere Gegenstände mit Enterotoxin kontaminiert werden. Auch die Beseitigung der Abfälle kann nicht ohne weiteres erfolgen. Da schon geringe Mengen an Enterotoxin auch nach Einatmung aerosolierter Partikel genügen, um eine Vergiftung auszulösen - bei oraler Aufnahme werden 0,14 mcg/kg KGW als krankmachende Dosis angesehen - ist der Schutz des Laborpersonals vorrangig.

Aufgabe dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob und in welchem Umfang Mittel der chemischen Desinfektion und proteolytische Enzyme zur Inaktivierung von Staphylokokkenenterotoxin B geeignet sind. Dabei sollte der Effekt der verschiedenen Wirkstoffe mittels immunologischer Verfahren geprüft werden.

2. SCHRIFTTUM

2.1. S t a p h y l o k o k k e n e n t e r o t o x i n e

2.1.1. Allgemeine Eigenschaften

Staphylokokkenenterotoxine werden unter bestimmten Bedingungen in Lebensmitteln und in geeigneten Nährmedien (BERGDOLL, 1969) hauptsächlich von koagulasepositiven, gelegentlich auch von koagulasenegativen Staphylokokkenstämmen produziert (BERGDOLL, 1970 u. 1972). Sie rufen nach oraler Aufnahme Lebensmittelvergiftungen hervor, die i.d.R. nach einer Inkubationszeit von einer bis sechs Stunden mit den typischen Symptomen Erbrechen und Durchfall (BERGDOLL, 1970 und 1972) einhergehen. Je nach Sensibilität und Konstitution der betroffenen Personen sowie Menge des aufgenommenen Enterotoxins variieren die Begleitsymptome: Schwindelgefühle, Kopfschmerzen, Schweißausbrüche, Unwohlsein, Muskelkrämpfe, Bauchkrämpfe und Erschöpfung. In schweren Fällen sind erhöhte, aber auch subnormale Temperaturen beobachtet worden, in sehr schweren Fällen Schockzustände. Todesfälle sind nur äußerst selten registriert worden. In der Regel erholt sich der Patient jedoch ohne ärztliche Behandlung nach 24 bis 72 Stunden (ANGELOTTI, 1969).

Aufgrund der Bildung spezifisch präzipitierender Antikörper konnten bisher sechs verschiedene Enterotoxintypen identifiziert werden. 1962 einigte man sich auf eine Benennung in alphabetischer Reihenfolge (CASMAN, BERGDOLL und ROBINSON, 1963), nachdem anfänglich die ersten zwei Typen als "E" ("Enteritis") und "F" ("Food poisoning") bezeichnet worden waren. Der Typ "E" (BERGDOLL, SURGALLA und DACK, 1959) wurde zu Typ B, der Typ "F" (CASMAN, 1960) zu Typ A. Die weiteren Typen sind: C (BERGDOLL, BORJA und AVENA, 1965), D (CASMAN et al., 1967) und E (BERGDOLL et al., 1971). Das Enterotoxin C wird im übrigen in die Varianten C₁ (BORJA und BERGDOLL, 1967) bzw. C₂ (AVENA und BERGDOLL, 1967) unterteilt. Diese Differenzierung erfolgt aufgrund einiger unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften - z.B. zweier verschiedener isoelektrischer Punkte (C₁ bei 8,6; C₂ bei 7,9).

Das unterschiedliche Verhalten im elektrischen Feld ist nach HUANG et al. (1967) auf den ungleichen Gehalt der Aminosäuren an freien basischen Gruppen zurückzuführen. Zwar bestehen auch geringe Unterschiede in den immunologischen Reaktionen (BERGDOLL, 1972), doch sind diese ohne praktische Bedeutung (BERGDOLL und ROBBINS, 1973). Von Interesse ist, daß hinsichtlich der antigenen Determinanten gewisse Beziehungen zwischen den Typen B und C sowie A und E zu bestehen scheinen (BERGDOLL und ROBBINS, 1973; BERGDOLL et al., 1973). Es ist unbekannt, wie viele bisher nicht immunologisch identifizierte Enterotoxintypen noch existieren, doch sind viele im Affenfütterungstest positive *Staphylococcus aureus*-Stämme gefunden worden, die nicht mit den bisher bekannten spezifischen Antienterotoxinen nachgewiesen werden konnten (BERGDOLL, HUANG und SCHANTZ, 1974; BERGDOLL und ROBBINS, 1973). Staphylokokkenenterotoxine sind einfache, niedermolekulare Proteine von schneeweißem Aussehen, die hygroskopisch sind und sich leicht in Wasser und Salzlösungen lösen lassen (BERGDOLL, 1970). Bei den Untersuchungen von gereinigten Enterotoxinen ließen sich Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren, alpha- bzw. beta-Hämolyse, Apyrase, Koagulase, Fibrinolyse sowie proteolytische Enzyme nicht nachweisen (BERGDOLL, 1970). Einige der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Typen A, B, C und E sind in der folgenden, den Publikationen von BERGDOLL et al. (1969) sowie BORJA et al. (1972) entnommenen Übersicht wiedergegeben:

Eigenschaft	A	B	C ₁	C ₂	E
Emetische Dosis/ ED ₅₀ in mcg/Affe	5	5	5	5-10	5-10
Stickstoffgehalt(%)	16,5	16,1	16,2	16,0	
Sedimentationsko- effizient (S _{20,w}) S	3,04	2,78	3,00	2,90	2,6
Diffusionskoeffizient (D _{20,w} × 10 ⁻⁷ cm ² /sec)	7,94	8,22	8,10	8,19	
Molekulargewicht	34700	30000	34100	34000	29600
Isoelektrischer Punkt	6,8	8,6	8,6	7,9	7,0
Absorptionsoptimum nm	277	277	277	277	277
Extinktion (E _{1%} ^{1 cm})	14,3	14,4	12,1	12,1	12,5

2.1.2. Spezielle Eigenschaften

Enterotoxin B läßt sich von den bisher bekannten Enterotoxintypen am einfachsten rein darstellen, insbesondere aufgrund der Tatsache, daß dieser Typ in sehr viel höheren Konzentrationen produziert werden kann (CHU, 1968; BERGDOLL, 1972). Infolgedessen betreffen die meisten Publikationen zu speziellen Eigenschaften von Enterotoxinen den Typ B (CHU und BERGDOLL, 1969). Da auch nur dieser Typ in die eigenen Untersuchungen zur Inaktivierung der serologischen Aktivität einbezogen werden sollte, beschränken sich die folgenden Angaben auf das Enterotoxin B.

Erstmals wurde Enterotoxin B von der Arbeitsgruppe um BERGDOLL rein dargestellt (BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK, 1959; HIBNICK und BERGDOLL, 1959). Später wurden noch verschiedene andere Verfahren erprobt, von denen sich insbesondere die von SCHANTZ et al. (1965) empfohlene Methodik durchgesetzt hat. Infolge der unterschiedlichen Reinheit der verschiedenen Enterotoxin B-Präparationen und der verschiedenen analytischen Methoden differieren die Angaben über die Eigenschaften dieses Enterotoxins zum Teil erheblich. Nach dem augenblicklichen Stand der Erkenntnisse, die insbesondere der Arbeitsgruppe um BERGDOLL zu verdanken sind, werden folgende Eigenschaften als gesichert angesehen: Enterotoxin B ist eine Polypeptidkette, die relativ hohe Mengen an Asparaginsäure (18,13 g/100 Enterotoxinprotein), Lysin (14,85 %), Tyrosin (11,50 %) sowie Glutaminsäure (9,45 %) enthält (BERGDOLL et al., 1965). Die N-endständige Aminosäure ist Glutaminsäure, die C-endständige Aminosäure Lysin (BERGDOLL et al., 1965; SPERO et al., 1965). Die Untersuchungen zur Bestimmung der Aminosäuresequenz durch stufenweisen Abbau haben ergeben, daß Enterotoxin B aus insgesamt 239 Aminosäureresten zu bestehen scheint (HUANG und BERGDOLL, 1970 a, b, c) und nicht, wie vorher angenommen, aus 252 (BERGDOLL et al., 1965). Im einzelnen handelt es sich dabei um Asparaginsäure (44 Reste), Lysin (33), Tyrosin (21), Glutaminsäure (20), Valin und Leucin (je 16), Serin (14), Threonin (13), Phenylalanin (12), Glycin und Isoleucin (je 9), Methionin (8), Prolin (6), Histidin, Alanin und Arginin (je 5), Cystein (2)

und einen Tryptophan-Rest (HUANG, SCHANTZ und BERGDOLL, 1975). Da keine freien SH-Gruppen im Enterotoxin B nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, daß die beiden Cystein-Reste, die sich ziemlich im Zentrum der Polypeptidkette an den Positionen 92 und 112 befinden, zu einem Cystin-Rest verknüpft sind (BERGDOLL et al., 1969; HUANG und BERGDOLL, 1970 c) und zwar in folgender Weise (BERGDOLL und ROBBINS, 1973):

Gln - Cys - Tyr - Phe - Ser - Lys - Lys - Thr - Asn - Asn - Ile,
 Met - Cys - Thr - Lys - Arg - Lys - Thr - Asn - Glu - His - ^{Asp}_{Ser}

Der Molekülteil aus den beiden "Halb-Cystinen" und den restlichen 19 Aminosäure-Resten wird auch als "Cystin-Schleife" bezeichnet. Aufgrund vergleichender Untersuchungen an anderen Enterotoxintypen gehen BERGDOLL und ROBBINS (1973) sowie HUANG, SCHANTZ und BERGDOLL (1975) davon aus, daß die Aminosäure-Reste in der Nähe des "Halb-Cystins" in der Position 92 möglicherweise den Hauptanteil der antigenen Komponente ausmachen, diejenigen in der Nähe des "Halb-Cystins" in der Position 112 aber den Hauptanteil der toxischen Komponenten. BERGDOLL, HUANG und SCHANTZ (1974) sind der Ansicht, daß alle Staphylokokkenenterotoxine eine gemeinsame toxophore Gruppe besitzen, die nicht mit den antigenen Determinanten verknüpft ist. Bei den verschiedenen Versuchen zum Verständnis der Rolle funktioneller Gruppen des Enterotoxin B wurden folgende im Hinblick auf eine Inaktivierung interessierenden Ergebnisse registriert:

Die Disulfidbrücken können reduziert und die SH-Gruppen des reduzierten Enterotoxins mit Jodacetat oder Jodacetamid alkyliert werden, ohne daß damit augenscheinliche Effekte auf physikalische und toxische Eigenschaften des Moleküls gegeben sind (DALI-DOWICZ et al., 1966). Auch nach anschließender Oxidation des reduzierten Enterotoxins mittels Sauerstoff wurden weder biologische noch serologische Aktivität verändert. Acetylierung (Acetylimidazol) und Nitrierung (Tetranitromethan) des Enterotoxinmoleküls ergaben, daß sechs "freie" Tyrosinreste vorhanden sind (CHU, 1968). Bei Acetylierung dieser sechs Tyrosinreste war die Antigen-Antikörperreaktion zwar nur unerheblich vermindert, bei Modifizierung von zehn Tyrosinresten war sie aber bereits um 20 %, bei Acetylierung von 14 Tyrosinresten um 90 %

herabgesetzt. Die Präzipitationstests mit dem nitrierten Enterotoxin B erbrachten keinerlei Hinweis auf eine Inaktivierung.

Veränderungen der Methioninreste mit Jodessigsäure (Alkylierung bei pH 2,7) und Wasserstoffperoxid (Oxidation bei pH 2,3) zeigten, daß es zu einer signifikanten Verminderung der Antigen-Antikörper-Reaktion kommt, wenn mehr als fünf oder sechs Methioninreste verändert werden. Die emetische Aktivität war bei Veränderung von sechs oder mehr Methioninresten vollkommen aufgehoben (CHU und BERGDOLL, 1969). Bei Veränderung der Carboxylgruppen mit Glycin-Methyl-Ester in Anwesenheit von Carbodiimid ergab sich eine deutliche Verringerung der Antigen-Antikörper-Reaktion, wenn mehr als 50 % der Gruppen modifiziert wurden. Die emetische Aktivität war nur wenig beeinflusst, wenn 29 Carboxylreste verändert waren, bei Modifikation von mindestens 35 Carboxylgruppen hatte sie deutlich abgenommen (CHU und CRARY, 1969). Die Guanidierung der freien Aminogruppen rief im Gegensatz zur Succinilierung keinen Verlust der biologischen Aktivität hervor, obwohl das Enterotoxin deutlich an Löslichkeit verlor (CHU, CRARY und BERGDOLL, 1969). Auch hinsichtlich der serologischen Aktivität wurde dieses unterschiedliche Verhalten beobachtet. Demgegenüber nahm beim carbamylierten Enterotoxin B zwar nicht die biologische, wohl aber die serologische Aktivität ab.

2.2. Desinfektionswirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen

Desinfektionsmittel oder Desinfektionswirkstoffe sind chemisch definierte Substanzen oder Mischungen von solchen, die pathogene Mikroorganismen nach relativ kurzen Einwirkungszeiten zerstören oder irreversibel inaktivieren (WILLINGER, 1972; EGGENS-SPERGER, 1975). Ihre Wirkung beschränkt sich meistens nur auf die vegetativen Formen der Bakterien, nicht unbedingt jedoch auch auf Bakteriensporen, Pilze oder Viren. Grundsätzlich wirken die Desinfektionsmittel selektiv auf die Proteine der Mikroorganismen im Sinne einer chemischen Veränderung. Sie treten vor allem mit einem für den Mikroorganismus essentiellen Fermentsystem der Zelle in Aktion oder bedingen eine irreversible Störung in der semipermeablen Membran der Bakterienzelle (WILLINGER, 1972; TRAUTWEIN und KRÜGER, 1977). Die Desinfektionsmittel differieren zum Teil erheblich in ihrem Wirkungsspektrum, in der erforderlichen Einwirkungszeit, in ihrer Belastbarkeit durch organische und anorganische Substanzen, in ihrer Lagerstabilität, in ihren toxischen Daten, in ihrer biologischen Abbaubarkeit, ihrem Geruch, ihrer Materialverträglichkeit und ihrer Wirtschaftlichkeit (EGGENSPERGER, 1975). Weitere wesentlich die Desinfektion beeinflussende Faktoren sind: Art, Menge und Stoffwechseltätigkeit der Mikroorganismen - Konzentration des Desinfektionsmittels - Temperatur und pH-Bereich - Oberflächenbeschaffenheit der zu desinfizierenden Flächen oder Gegenstände - vorhergehende Reinigung (WILLINGER, 1972). Nach SPICHER (1970) sollte ein ideales Desinfektionsmittel folgenden Anforderungen gerecht werden: Breites Wirkungsspektrum - rasche Wirkung - irreversible Wirkung - zuverlässige Wirkung - Stabilität - Erhaltung des Gebrauchswertes - Unschädlichkeit für Mensch und Tier - Geruchsarmut - Wirtschaftlichkeit. Das Desinfektionsmittel, das alle aufgezählten Anforderungen erfüllt, ist bisher noch nicht gefunden, so daß man gezwungen ist, sich auf die für den jeweiligen Verwendungszweck wichtigsten Forderungen zu beschränken (SPICHER, 1970).

Im folgenden soll kurz auf die Bedeutung verschiedener Wirkstoffgruppen eingegangen werden, wobei die von EGGENS-SPERGER (1975)

erstellte und anschließend wiedergegebene Übersicht als Leitfaden dient.

Übersicht der Verbindungsklassen der heute handelsüblichen Desinfektionsmittel:

1. Alkalien
2. Schwermetalle
 - a) Ionen
 - b) org. Verbindungen
3. Peroxide
4. Halogene oder Halogenverbindungen
5. Epoxide
6. Alkohole
7. Aldehyde
 - a) in freier bzw. in Hydratform
 - b) Derivate: O-Acetale
N-Acetale
8. Carbonsäuren
 - a) freie Carbonsäuren
 - b) Ester
 - c) Lactone
 - d) Amide
9. Phenole
 - a) Monophenole
 - b) Diphenylderivate
10. Oberflächenaktive Verbindungen
 - a) anionaktive
 - b) kationaktive
 - c) nicht ionogene
 - d) Amphotenside
11. Spezielle Wirkstoffe

2.2.1. Alkalien

Die bakterizide, fungizide und virusinaktivierende Wirkung von Alkalien, zu denen z.B. Natronlauge, Kalilauge, Ätzkalk, Silikate und Soda gehören, beruht auf den OH-Ionen, die besonders bei höheren Temperaturen (über 40 °C) die Säureamidbindung in der Mikroorganismenzellwand hydrolytisch spalten können (EGGENSPERGER, 1975). Die Anwesenheit organischer Substanz beeinflusst die desinfizierende Wirkung nach WALLHÄUSSER und SCHMIDT (1967) nur unerheblich, während SIEVERT und WEGNER (1972) von einer deutlich

herabgesetzten Wirkung berichten. Die schlechte Haut- und Materialverträglichkeit schränkt die praktische Verwendung der Alkalien sehr ein. Es werden nicht nur Metalle - besonders Zinn und Aluminium, nicht aber Stahl (WILLINGER, 1972) -, sondern auch Kunststoffe wie PVC und Polyester durch Alkalien stark angegriffen (WILLINGER, 1972; EGGENSPERGER, 1975; TRAUTWEIN und KRÜGER, 1977).

2.2.2. Schwermetalle

Die Verwendung von Schwermetallen und ihrer organischen Verbindungen als Desinfektionsmittel wird nach Ansicht von EGGENSPERGER (1975) mit zunehmender Diskussion über die biologische Abbaubarkeit zurückgehen. Die Schwermetallsalze reagieren mit Mercaptogruppen-haltigen Enzymen zu Metallsulfiden, wodurch die Funktion der Enzyme geblockt wird. Organische Quecksilberverbindungen wie auch Organozinnverbindungen sind durchwegs hautverträglich, während Metalle von den erstgenannten Verbindungen stark angegriffen werden (EGGENSPERGER, 1975). Bei Anwesenheit organischer Substanzen ist nur eine geringe oder keine Wirkung gegeben (SIEVERT und WEGNER, 1972).

2.2.3. Peroxide

Der Wirkungsmechanismus der Peroxide beruht auf der Abspaltung von naszierendem Sauerstoff (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967) und der sich daraus ergebenden Oxidation der Mercaptogruppen von entsprechenden Enzymen zu Disulfiden (EGGENSPERGER, 1975). Die desinfizierende Wirkung der Peroxide (z.B. Wasserstoffperoxid, Natriumperborat, Kaliumpermanganat) ist nur flüchtig und oberflächlich (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967). Im Gegensatz zu Kunststoffen ist bei Metallen keine Materialverträglichkeit gegeben (EGGENSPERGER, 1975). Ebenfalls auf dem Prinzip der Sauerstoffabspaltung beruht die Desinfektion mit Peressigsäure (PES), die ursprünglich von HUTCHINGS und XEZONES (1949) sowie GREENSPAN und MAC KELLAR (1950) eingeführt wurde und aufgrund ihres weiten Wirkungsspektrums heute in der Praxis eine weite Anwendung gefunden hat (SPRÖSSIG, 1973). Im deutschen Sprachraum hat sich insbesondere die Arbeitsgruppe um SPRÖSSIG (MÜCKE und SPRÖSSIG,

1967; SPRÖSSIG und MÜCKE, 1967; KOCH, SPRÖSSIG und MÜCKE, 1967; SPRÖSSIG, MÜCKE und TILGNER-PETER, 1967) über die antimikrobielle Wirkung der PES gearbeitet. Als entscheidende Voraussetzung für die schnelle antimikrobielle Wirkung der PES wird die spezifische Diffusionsfähigkeit durch die Bakterienzellmembran angesehen. Die PES führt dann in der Zelle - bedingt durch ihr hohes Oxidationspotential - zu einer irreversiblen Störung des Enzymsystems. Der sauren Reaktion kommt nur eine unterstützende Wirkung zu. Die PES entfaltet auch bei niedrigen Temperaturen ihre volle Wirkung. Zwar ist das Eindringungsvermögen der PES bei porösem Material etwas herabgesetzt und auch bei Anwesenheit organischer Substanzen eine verminderte Desinfektionswirkung zu beobachten, doch lassen sich beide Faktoren durch Verlängerung der ohnehin kurzen Einwirkungszeit und Erhöhung der geringen Wirkstoffkonzentration leicht ausgleichen. Die korrosive Eigenschaft der hochprozentigen PES gegen unedle Metalle kommt bei der praktischen Anwendung infolge kurzer Einwirkungszeiten und niedriger Wirkstoffkonzentrationen kaum zur Auswirkung. Die Gebrauchslösung ist für den Menschen im allgemeinen nicht schädlich (SPRÖSSIG, 1973). Einzelheiten, z.B. über weitere allgemeine Eigenschaften der PES, ihre mikrobizide Wirkung und Möglichkeit zur Sterilisation von Gegenständen können o.a. Arbeiten und auch dem Übersichtsreferat von TICHACEK (1972) entnommen werden.

2.2.4. Halogene und Halogenverbindungen

Von den Halogenen besitzen zur Zeit nur Chlor und Jod bzw. deren Abspalter in der Praxis eine Bedeutung (EGGENSPERGER, 1975). Die gebräuchlichsten Chlorverbindungen bei der Desinfektion sind Hypochlorite, Chlorkalk sowie Chloramine. Chloramine besitzen infolge einer verzögerten Abspaltung von Chlor den Vorteil einer verlängerten Wirkung, brauchen aber eine wesentlich längere Einwirkungszeit als Chlor. Bei der Dosierung von Chlor und chlorabspaltenden Verbindungen geht man von dem "verfügbaren freien Chlor" aus. Von Einfluß auf die Wirksamkeit der "Chlorierung" sind u.a. pH-Wert (saurer pH-Bereich verkürzt Einwirkungszeit), Konzentration, Temperatur (Effekt steigt mit Temperatur), Anwesenheit organischer

Substanzen (bereits geringe Mengen können die Wirkung erheblich einschränken, so daß die "Chlorzehrung" stets berücksichtigt werden muß) bzw. anorganischer Verbindungen, wie Sulfide, Thio-sulfate und Eisensalze (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967; SPICHER, 1970). Die Wirkung der Halogene beruht einmal auf der oxidierenden Wirkung ihrer wäßrigen Lösung, wodurch die Sulfhydrylgruppen der Enzyme ebenfalls zu Disulfiden oxidiert werden; zum anderen auf ihrer direkten Reaktion mit den Aminogruppen der Zellproteine zu N-Halogenverbindungen (EGGENSPERGER, 1975). Da letztere Reaktion mit allen Proteinen stattfindet, wird die schon erwähnte starke Reduktion der Wirkung in Gegenwart anderer Proteine verständlich. Während die Hautverträglichkeit der Chlorverbindungen als gut und die der Jodverbindungen als durchschnittlich bezeichnet wird, ist die Materialverträglichkeit - sowohl bei Metallen als auch bei Kunststoffen - durchwegs schlecht (EGGENSPERGER, 1975). Jod hat eine ausgezeichnete Wirkung gegen Bakterien, Sporen, Pilze und Viren. Gegen eine breite Anwendung sprechen folgende Nachteile: Begrenzung des antimikrobiellen Effekts durch die starke Affinität zu organischen Stoffen, Schleimhautreizung, Allergisierung, Braunfärbung, Korrosion von Metallen (WILLINGER, 1972; EGGENSPERGER, 1975; TRAUTWEIN und KRÜGER, 1977). Weitgehend vermieden werden die erwähnten ungünstigen Auswirkungen durch Jodophore. Dabei handelt es sich um Lösungen von Jod in anionischen, kationischen oder nichtionogenen Verbindungen. Mit gleich gutem Desinfektionseffekt verbinden die Jodophore deshalb im Vergleich zu Jod bessere Netz-, Tiefen- und auch zusätzliche Reinigungswirkung (WILLINGER, 1972; TRAUTWEIN und KRÜGER, 1977).

2.2.5. Epoxide

Nur der einfachste Vertreter der Epoxide, das gasförmige Äthylen-oxid, besitzt zur Zeit als Sterilisierungsmittel von hitzelabilen Materialien, speziellen Kunststoffgeräten etc. eine praktische Bedeutung (EGGENSPERGER, 1975; TRAUTWEIN und KRÜGER, 1977). Die Wirkung beruht auf einer Reaktion mit freien Amino- und Amidgruppen der Zellwandproteine und einer Blockierung von Fermentsystemen. Die Hautverträglichkeit der Epoxide ist sehr schlecht, die Material-

verträglichkeit (Metalle, Kunststoffe) aber gut (EGGENSPERGER, 1975).

2.2.6. Alkohole

Der absolute "Alkohol" wirkt nicht bakterizid, erst ein gewisser Anteil an Wasser ermöglicht eine Keimtötung (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967). Bei den Alkoholen wächst die desinfizierende Wirkung ganz allgemein mit dem Molekulargewicht und der Kettenlänge. Weiterhin gilt: n-primäre Alkohole > iso-primäre Alkohole > sekundäre Alkohole > tertiäre Alkohole (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967). Praktische Bedeutung erlangt haben jedoch nur einige wenige Alkohole: Äthylalkohol, Propylalkohol und Isopropylalkohol (SPICHER, 1970). Durch die Einführung von Halogenen kann die mikrobizide Wirkung gesteigert werden (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967; EGGENSPERGER, 1975). Die Alkohole wirken in den üblicherweise benutzten Konzentrationen als Proteinkoagulantien. Die zunächst im kolloidalen Zustand vorliegenden Proteine der Bakterienzellen, von denen die meisten enzymatisch wirksam sind, verlieren ihre Funktionsfähigkeit. In Grenzkonzentrationen können Alkohole das Zellwachstum inhibieren, indem sie die Produktion der für die rasche Zellteilung notwendigen Metaboliten stören (EGGENSPERGER, 1975). Die Haut- und Materialverträglichkeit sind nach Angaben letztgenannten Autors durchschnittlich bis gut.

2.2.7. Aldehyde

Unter den Aldehyden kommen als Desinfektionsmittel in Frage: Formaldehyd, Glyoxal, Glutardialdehyd und Glyoxylsäureester; die wichtigste Verbindung ist jedoch der Formaldehyd, ein stechend riechendes Gas, das als 35 - 37 Vol.-%ige wäßrige Lösung unter dem Namen Formalin oder Formaldehyd solutus im Handel ist (DGHM, 1969). Der Formaldehyd ist nur in Gegenwart von Wasser mikrobizid wirksam (SPICHER, 1970). Aldehyde reagieren mit freien Aminogruppen und freien Säureamidgruppen der Zellwandproteine primär zu N-Methylolverbindungen. Diese Reaktion ist reversibel und reicht zur Abtötung oder irreversiblen Inaktivierung der Zellen nicht aus. Die N-Methylolverbindungen können jedoch mit weiteren

freien Amino- und Amidgruppen unter Ausbildung von stabilen Methylenbrücken intramolekular, vorzugsweise jedoch intermolekular irreversibel reagieren. Der damit eintretende Gerbeffekt der Zellwandproteine führt zu einer Störung des osmotischen Gleichgewichtes und dadurch schließlich zum Absterben des Mikroorganismus (EGGENSPERGER, 1975). Formalin ist nicht materialschädigend und wird vor allem aufgrund seiner breiten Wirkung und seines relativ niedrigen Preises eingesetzt. Durch Erhöhung der Temperatur, durch Zusatz von Seifen, oberflächenaktiven Verbindungen oder Alkohol sowie Einstellung auf alkalische pH-Werte (pH 10) wird die desinfizierende und diffundierende Wirkung von Formalin verstärkt (SPICHER, 1970; WILLINGER, 1972). Unerwünschte Effekte der Formalindesinfektion sind insbesondere die Reizwirkung gegenüber Schleimhäuten, die schlechte Hautverträglichkeit, der unangenehme Geruch wie auch der sog. Eiweißfehler.

2.2.8. Carbonsäuren

Von den Carbonsäuren (z.B. Kohlensäure, Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Sorbinsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Benzoesäure etc.) und ihren Derivaten werden vor allem Glyoxylsäure, eine natürlich vorkommende Säure, sowie ihre Ester zur Herstellung von Desinfektionsmitteln verwendet. p-Hydroxy-benzoesäureester und Pyrokohlensäureester werden überwiegend zur Konservierung eingesetzt (EGGENSPERGER, 1975). Während bei den Estern durchschnittliche bis gute Haut- und Materialverträglichkeit gegeben ist, sind Metalle den freien Säuren gegenüber anfällig.

2.2.9. Phenole

Phenol (von LISTER zur Antisepsis in die Chirurgie eingeführt) wird heute zur Desinfektion kaum mehr verwendet, nachdem von verschiedenen Seiten festgestellt wurde, daß Alkyl- oder Aryl-Phenole, insbesondere aber halogenierte Phenole eine weitaus höhere mikrobizide Wirkung aufweisen als das unsubstituierte Phenol (EGGENSPERGER, 1975). Außerdem sind der charakteristische Geruch, die Toxizität und die geringe Hautverträglichkeit ein großer Nachteil (SPICHER, 1970). Zumeist werden die verschiedenen substitu-

ierten Phenole so kombiniert, daß man eine breite, teilweise synergistische Wirkung gegen alle Bakterien und auch gegen behüllte Viren erzielt. In Konzentrationen von ca. 0,5 % koagulieren die Phenole die Proteine der Mikroorganismen; schon in geringen Konzentrationen können sie als Gift der oxidativen Phosphorylierungsvorgänge wirken. Durch eine Verminderung der Oberflächenspannung, durch Temperaturerhöhung, Salzzusatz, sauren pH-Wert wird eine Verbesserung der mikrobiziden Wirkung erreicht (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967; WILLINGER, 1972). Hinsichtlich des Einflusses organischen Materials liegen gegensätzliche Aussagen vor, doch ist eine gewisse Indifferenz offensichtlich gegeben (TRAUTWEIN und KRÜGER, 1977). Haut- und Materialverträglichkeit sind ausreichend (EGGENSPERGER, 1975).

2.2.10. Oberflächenaktive Verbindungen

Oberflächenaktive Substanzen sind Verbindungen, die in verdünnten Lösungen als Netzmittel, Emulgatoren oder Detergentien wirken und beim Schütteln der Lösung zur Schaumbildung führen. Sie lassen sich nach ihrem chemischen Aufbau in vier Gruppen einteilen. (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967): Anionische Verbindungen (Seifen und Detergentien) - kationische Verbindungen (quaternäre Verbindungen) - amphotere Verbindungen (Alkyglycin; Tego) - nicht-ionische Verbindungen (Polyoxyalkylene; Tweene).

Die benetzenden, emulgierenden und adsorbierenden Eigenschaften der oberflächenaktiven Verbindungen basieren auf dem Vorhandensein einer hydrophoben Alkylgruppe und einer hydrophilen Gruppe, z.B. einer Carboxylat-, Sulfat-, Sulfonat- oder Polyäthergruppe (EGGENSPERGER, 1975). Die Verbindungen reichern sich auch an der Grenze zwischen der lipidhaltigen Membran der Bakterienzelle und dem umgebenden wäßrigen Medium an. Man darf nach EGGENSPERGER (1975) annehmen, daß dadurch die normalen Funktionen der Zellmembran aufgehoben werden.

Während die anionischen und nichtionischen oberflächenaktiven Verbindungen keine oder nur eine sehr geringe bakterizide Wirkung zeigen, besitzen die quaternären Ammonium- und Phosphoniumverbindungen wie auch die Amphotenside als Desinfektionsmittel

eine praktische Bedeutung, besonders in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie. Die quaternären Verbindungen sind praktisch nicht toxisch, hautverträglich und geruchlos sowie wirtschaftlich in der Anwendung. Von Nachteil ist die Unverträglichkeit mit Seifen und anionischen Detergentien, die Unwirksamkeit gegen Mykobakterien, die geringe Wirkung gegen Sporen und Pseudomonaden, die Reduktion der Wirkung durch organische Substanzen und - wenn auch wesentlich geringer - durch hartes Wasser, die Adsorption an Textilgewebe und Wolle sowie Korrosionserscheinungen gegenüber Eisen. Im alkalischen pH-Bereich und bei höheren Temperaturen (40 °C) ist die Wirksamkeit verstärkt.

Die Amphotenside, bei denen es sich um hochmolekulare Aminosäuren handelt, wirken durch ihre anionische Gruppe oberflächenaktiv und reinigend und durch ihre kationische Gruppe mikrobizid - infolge Schädigung der Zellwand und Denaturierung der Mikroorganismenproteine. Sie haben gegenüber den kationischen Verbindungen den Vorteil einer Wirkung gegenüber Mykobakterien sowie einer geringeren Reduktion der Wirkung durch organische Substanzen (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967; SPICHER, 1970; WILLINGER, 1972; EGGENSBERGER, 1975; TRAUTWEIN und KRÜGER, 1977).

2.2.11.

Hinsichtlich der oralen Toxizität der erwähnten Wirkstoffgruppen bestehen nach EGGENSBERGER (1975) die in der folgenden Übersicht wiedergegebenen Vorstellungen:

Vergleich der oralen Toxizität von mikrobiziden Wirkstoffen in den Gebrauchslösungen (+ = unbedenklich, $\pm$ = wenig bedenklich, - = bedenklich).

Alkalien	-	Aldehyde	$\pm$
Schwermetalle		Carbonsäuren	
Organo-Hg-Verbindungen	-	freie Säure	$\pm$
Organo-Zinnverbindungen	$\pm$	Ester	$\pm$
Peroxide	-	Phenole	$\pm$
Halogene		Kationaktive Verbindungen	+
Chlor	+	Amphotenside	+
Jod	+		
Epoxide	-		
Alkohole	$\pm$		

2.3. Der Einfluß von chemischen Desinfektionswirkstoffen auf Staphylokokkenenterotoxin B

Staphylokokkenenterotoxin B ist gegen Alkalien offensichtlich relativ resistent. SCHANTZ et al. (1965) konnten nämlich bei einer auf pH 10 eingestellten Enterotoxinlösung mehrere Tage lang keine Abnahme der biologischen Aktivität feststellen. CHU (1968) fand bei ergänzenden Untersuchungen zur serologischen Aktivität, daß die Antigen-Antikörper-Reaktion erst ab pH-Werten von 12,5 deutlich vermindert und nach 5 min bei pH-Werten über 13,0 vollständig aufgehoben war. Während über den Einfluß von Schwermetallen keine Untersuchungen bekannt sind, wurden Peroxide vereinzelt eingesetzt, allerdings zumeist nicht zum Zweck der Inaktivierung von Enterotoxin B, sondern zur Ermittlung der Bedeutung einzelner Peptidgruppen im Enterotoxinmolekül. Dabei stellte sich heraus, daß Wasserstoffperoxid (pH 2,3) nach 12 Stunden Inkubation bei 37 °C die emetische Aktivität wie auch die serologische Aktivität um so stärker einschränkte, je höher die Anzahl der durch H_2O_2 modifizierten Methioninreste des Enterotoxin B war (CHU und BERGDOLL, 1969). Auch durch Perameisensäure war eine teilweise Inaktivierung von Enterotoxin B möglich (HUANG, SCHANTZ und BERGDOLL, 1969).

Versuche von JORDAN, DACK und WOOLPERT (1931), 5 ml eines enterotoxinhaltigen Staphylokokkenfiltrats mit 0,1 ml einer 0,0915 %igen chlorhaltigen Lösung innerhalb von 3 min zu inaktivieren, schlugen fehl. Demgegenüber ergaben orientierende Untersuchungen von TERPLAN und ZAADHOF (1974), daß die serologische Aktivität durch Zusatz von Hypochlorit (mit 0,5 % aktivem Chlor) vollständig zerstört wird. HINTERBERGER und MEYER (1975) kamen zu dem Ergebnis, daß nach Einwirkung von 50 ppm freiem Chlor in alkalischer Phase eine Konzentration von 50 mcg Enterotoxin B/ml Wasser sicher inaktiviert wird. Sie bestätigten dieses im Einfach-Gel-Diffusionstest erhaltene Ergebnis durch den "Affenfütterungstest".

Alkohol wurde verschiedentlich zur Ausfällung von Enterotoxin B im Rahmen der Reinigung eingesetzt (BERGDOLL et al., 1951; BERG-

DOLL, 1954; BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK, 1959; FREA, McCOY und STRONG, 1963; u.a.), doch liegen keine Angaben darüber vor, ob und inwieweit Enterotoxin B von Alkoholen inaktiviert werden kann.

Die ersten Mitteilungen über die Wirkung eines Aldehyds, und zwar des Formalins, auf die biologische Aktivität von Kulturfiltraten enterotoxinogener Staphylokokken stammen von DOLMAN und WILSON (1938) sowie MINETT (1938). Erstere beschrieben, daß nach Zusatz von 0,3 % Formalin bei Kühlschranktemperaturen gelagerte Kulturfiltrate je nach Herkunft des Stammes 5 bzw. 14 Monate lang ihre biologische Aktivität im Kätzchentest behielten. Sofern die mit Formalin versetzten Kulturfiltrate bei 37 °C inkubiert wurden, war selbst nach 3 Monaten nur ein geringer Rückgang in der Aktivität zu verzeichnen gewesen. Demgegenüber kam MINETT (1938) zu dem Ergebnis, daß mit Formalin behandelte Kulturfiltrate enterotoxinogener Staphylokokken - Endkonzentration des Formalin 0,3 % - zwar nach 36 bzw. 48 Stunden bei 37 °C noch im Kätzchentest positiv waren, nach 10 Tagen aber bereits eine Inaktivierung eingetreten war. THATCHER und MATHESON (1955) ergänzten die Angaben von MINETT mit dem Hinweis, daß bereits nach drei Tagen keine emetischen Reaktionen mehr zu beobachten waren. Während die angeführten Untersuchungen zu dem Zweck durchgeführt wurden, Möglichkeiten zur Ausschaltung nicht durch Staphylokokkenenterotoxin bedingter Reaktionen im Kätzchentest zu prüfen und der Enterotoxintyp nicht ermittelt wurde, wurden in den späteren Publikationen in erster Linie die Möglichkeiten der Herstellung eines Enterotoxoids verfolgt. BERGDOLL, SURGALLA und DACK (1959) wählten für die Umwandlung von Enterotoxin in Enterotoxoid (Antigen in 0,4 % Formalin) eine Inkubationsdauer von 18 Tagen bei 30 °C. Später wurde dieses Verfahren aufgrund nicht vollständiger Detoxifizierung der Enterotoxinmoleküle modifiziert (BERGDOLL, 1966). Umfangreiche Versuche mit ca. 20 % reinem Enterotoxin B mit 0,7 % Formalin bei verschiedenen Temperaturen (30 bis 50 °C), Inkubationszeiten (1 Stunde bis 4 Wochen) bzw. pH-Werten (pH 4 bis 9) hatten nämlich erbracht, daß eine 24 stündige Bebrütung bei 50 °C bzw. eine dreiwöchige Bebrütung bei 37 °C - jeweils pH 8 - die besten Entero-

toxoiden erbrachte. Auffällig war, daß bei derartig hergestellten Enterotoxoiden die Fähigkeit zur Antikörperbildung in vivo zwar nicht eingeschränkt war, die Antigen-Antikörper-Reaktion in vitro (Einfach-Gel-Diffusionstest) aber vollständig aufgehoben war. SILVERMAN, ESPESETH und SCHANTZ (1969) verglichen dann die Eignung verschiedener Einwirkungszeiten des Formalins (Konzentrationen: 0,1 bis 1,4 %) auf gereinigtes Enterotoxin B bei pH 7,3. Sie stellten dabei fest, daß nach 6 tägiger Inkubation bei 37 °C die Fähigkeit des Enterotoxoids, mit dem spezifischen Antikörper in vitro zu reagieren, in Abhängigkeit von der Formalinkonzentration abgenommen hatte. Allerdings waren die Diffusionsrate in der einfachen linearen Immunodiffusion nicht oder nur kaum verändert - wenn auch die Banden nur schwach ausgeprägt waren - und die "Koaleszenz" mit unbehandeltem Enterotoxin B im OUCHTERLONY-Test noch vorhanden. Ergänzende Versuche ergaben dann, daß bereits nach achtstündiger Einwirkung von 0,15 bzw. 0,3 % Formalin eine geringe Abnahme in der präzipitierenden Aktivität gegeben war und nach 32 Wochen nur noch ca. 20 % des präzipitierbaren Antikörpers auch präzipitiert wurden. Hinsichtlich der biologischen Eigenschaften des Enterotoxoids kamen die Autoren zu folgenden Ergebnissen: Bis zu 48 Stunden bei 37 °C mit 0,1 bzw. 0,3 % Formalin behandeltes Enterotoxin zeigte keinerlei Einbuße der emetischen Aktivität (Affenfütterungstest), nach neun Tagen war der emetische Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar. Letzteres traf auch für sechs Tage bei 37 °C behandeltes Enterotoxin mit 0,6 bis 1,4 % Formalin zu (10 mcg/kg KGW i.v.). Die immunogene Wirkung war demgegenüber selbst nach vier bis fünf Wochen Inkubation bei 37 °C (0,3 % HCHO) erhalten. Während einerseits BERGDOLL (1966) ein vollständiges Ausbleiben der Präzipitationsreaktionen (Einfach-Gel-Diffusionstest) beim Enterotoxid konstatierte, andererseits aber SILVERMAN, ESPESETH und SCHANTZ (1969) nur eine teilweise Abnahme der präzipitierenden Eigenschaften registrierten, konnten WARREN, SPERO und METZGER (1973) beide Beobachtungen machen, und zwar in Abhängigkeit vom pH-Wert. Diese Autoren inkubierten reines Enterotoxin B 30 Tage bei 37 °C in 1 % Formaldehyd solutus bei drei verschiedenen pH-Werten. Sie fanden dabei, daß die antigenen Determinanten des nativen Entero-

toxins durch Formalin im sauren pH-Bereich (pH 5,0) nur geringgradig zerstört wurden, im neutralen Bereich (pH 7,5) aber beträchtlich stärker und im alkalischen Bereich (pH 9,5) vollständig. Infolgedessen konnte mit dem bei pH 9,5 gewonnenen Enterotoxoid keine Präzipitation des spezifischen Antikörpers *in vitro* mehr erzielt werden. Hinsichtlich der biologischen Aktivität der drei Enterotoxide bestanden insofern keine Unterschiede, als im Tierversuch mit Rhesusaffen keine Anzeichen mehr für eine toxische Wirkung gefunden werden konnten. Die immunogene Wirkung war allerdings bei dem bei pH 9,5 hergestellten Enterotoxoid deutlich schlechter als bei den beiden anderen Enterotoxoiden. Diese Unterschiede wurden von den gleichen Autoren auf eine differierende Polymerisation des Enterotoxins durch Formaldehyd zurückgeführt (WARREN, SPERO und METZGER, 1974). Von Bedeutung hinsichtlich des Wirkungsmechanismus von Enterotoxin B ist im übrigen die Beobachtung von SPERO, LEATHERMAN und ADLER (1975), daß die mit Formalin detoxifizierten Präparationen von Enterotoxin B (pH 5,0, 7,5 bzw. 9,5) mitogen waren, die Wirkung allerdings etwas geringer war als bei nativem Enterotoxin B.

Obwohl keine Untersuchungen zur Inaktivierung von Enterotoxin B durch verschiedene Säuren vorzuliegen scheinen, beschäftigen sich doch einige Publikationen mit dem Einfluß des sauren pH-Bereiches. Die anfänglich zu dieser Fragestellung durchgeführten Versuche erbrachten i.d.R. uneinheitliche Resultate (DACK, 1952). So berichtete MINETT (1938), daß auf pH 5,0 eingestelltes enterotoxinhaltiges Kulturfiltrat nach 24 Stunden noch aktiv war, nicht mehr aber nach einer Woche. In einer weiteren davon unabhängigen Versuchsreihe war das Toxin jedoch auch nach einer Woche noch aktiv. Mehr Wert dürfte den Angaben zukommen, die bei Enterotoxinen registriert wurden, deren serologischer Typ zuvor exakt ermittelt worden war. Nach SCHANTZ et al. (1965) war bei einem in Phosphatpuffer gelösten und auf pH 4 eingestellten reinen Enterotoxin B selbst nach einigen Tagen noch keine Abnahme der biologischen Aktivität zu erzielen. CHU (1968) beobachtete in Fortsetzung dieser Untersuchungen, daß die Antigen-Antikörper-Reaktion bis pH 2,0 nicht deutlich verändert war, bei Werten von weniger als pH 1,5 aber innerhalb fünf min zerstört wurde. CHU

und BERGDOLL (1969) ergänzten diese Angaben noch durch den Hinweis, daß die serologische Aktivität bei pH 2,3 nach zwölf Stunden noch unverändert war.

HOPPER und DEVALOIS (1961) fanden in Versuchen an Rhesusaffen, daß 100 mcg Enterotoxin B durch Zusatz von 2,5 % Propiolacton innerhalb von zwölf Stunden bei Zimmertemperatur so weitgehend detoxifiziert wurden, daß kein Erbrechen mehr ausgelöst wurde.

Angaben über den Einfluß von Phenolen und oberflächenaktiven Verbindungen auf die Aktivität von Enterotoxin B konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

2.4. Einfluß proteolytischer Enzyme auf Staphylokokken enterotoxin B

Die in den ersten Jahren der Enterotoxinforschung berichteten Ergebnisse widersprechen einander. Während anfänglich mitgeteilt wurde, daß Enterotoxine durch Trypsin (MINETT, 1938) und Pepsin (DAVISON, 1940) inaktiviert werden konnten, wurde diese Möglichkeit von HAMMON (1941) für beide Enzyme verneint. Die Untersuchungen an reinem Enterotoxin haben später die Ansicht von HAMMON (1941) bestätigt. So war Trypsin nicht in der Lage, Enterotoxin B zu inaktivieren (BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK, 1959; SCHANTZ et al., 1965; SPERO, WARREN und METZGER, 1973). Die umfassenden Untersuchungen von SPERO, WARREN und METZGER (1973) haben gezeigt, daß Trypsin zwar innerhalb von 30 min bei 30 °C und pH 9,0 eine spezifische Peptidbindung des Enterotoxinmoleküls zwischen Position 97 und Position 98 spaltet, die biologische und serologische Aktivität dabei aber unverändert bleiben. Demgegenüber war bei zuvor alkyliertem, reduziertem, insbesondere aber bei oxidiertem Enterotoxin B nach 24 stündiger Einwirkung von Trypsin (pH 8,5) eine herabgesetzte Stabilität zu registrieren (HUANG, SCHANTZ und BERGDOLL, 1969). Auch Chymotrypsin, Rennin bzw. Papain zerstörten die biologische Aktivität nicht - in Gegensatz zu Ficin und Protease (SCHANTZ et al., 1965). Bei Pepsin ist offensichtlich der pH-Wert des Reaktionsgemisches von erheblicher Bedeutung,

da bei pH-Werten von 2 die Aktivität des Enterotoxins deutlich vermindert war, während das Pepsin bei höheren pH-Werten ohne inaktivierende Wirkung blieb (SCHANTZ et al., 1965; BERGDOLL, 1970).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

Der Einfluß verschiedener Desinfektionsmittel auf die serologische Aktivität von Enterotoxin B wurde unter Verwendung von *Staphylococcus aureus* 243 (ATCC 14458) geprüft. Dieser Stamm war dem Institut von Professor M.S. Bergdoll, Food Research Institute of the University of Wisconsin in Madison (USA) zur Verfügung gestellt worden. Im Hinblick auf den geringeren Arbeitsaufwand und die Vermeidung einer Abschwächung des Enterotoxinbildungsvermögens wurden die Staphylokokken an Porzellanbruchstücke angetrocknet aufbewahrt (BAUMGART, 1970). Zur Anzucht der Kultur wurden jeweils zwei Porzellanbruchstücke in 200 ml Nährbouillon (Oxoid; CM 1) verbracht, die 12 Stunden bei 37 °C bebrütet wurde. Zur eigentlichen Enterotoxinproduktion wurde eine Bouillon aus 4 % Protein Hydrolysate Powder (Mead Johnson) - pH 6,8 - verwendet, die mit 5 % der staphylokokkenhaltigen Nährbouillon beimpft wurde. Das beimpfte PHP-Medium wurde in sterile 2 l-Erlenmeyerkolben in Mengen von ca. 700 ml abgefüllt und anschließend im Schüttelbrutschrank (275 Umdrehungen/min) 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach der Bebrütung wurde das PHP-Medium in einen Druckbehälter verbracht und mit einem Druck von etwa 5 atü über ein Druckfiltrationsgerät (Selecta, MD 293/O) durch einen Vorfilter (Selecta, GF 92) und einen Hauptfilter (Selectron, BA 90) mit einer Porengröße von 0,6 µm gepreßt. Das so gewonnene Kulturfiltrat war bernsteingelb und klar und wurde in 1000 ml-Portionen im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die serologische Aktivität wurde sofort und vor jeder Versuchsreihe qualitativ (OUCHTERLONY-Test) und quantitativ (MANCINI-Test) ermittelt. Der Toxingehalt des hergestellten Kulturfiltrats war 75 mcg/ml, der pH-Wert lag bei $7,4 \pm 0,1$. Für Versuche mit Enterotoxin B in höheren Konzentrationen wurde ein Teil des Kulturfiltrats lyophilisiert. Dazu wurde das Filtrat schnell und schonend eingefroren (-20 °C) und anschließend in einer Gefrier-

trocknungsanlage lyophilisiert (Christ, Delta Ia). Das Lyophilisat wurde in luftdicht verschlossenen Fläschchen bei -20°C gelagert.

Es wurde geprüft, ob und inwieweit die serologische Aktivität des Kulturfiltrats durch chemische Einflüsse herabgesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden insbesondere gebräuchliche Desinfektionsmittel aus folgenden Verbindungsklassen (EGGENSPERGER, 1975) herangezogen: Alkalien, Peroxide, Halogene, Alkohole, Aldehyde, Carbonsäuren, Phenole und oberflächenaktive Verbindungen. Im einzelnen handelte es sich bei den Desinfektionsmitteln um: Natronlauge (Merck), Wasserstoffsuperoxid (Merck), Peressigsäure (Peroxid Chemie), Kaliumpermanganat (Merck), Natriumhypochlorit (Merck), Calciumhypochlorit (Bender u. Hobein), Chloramin T (Merck), Jodophor VR 2875-6 (Henkel), Äthylalkohol 96 % (Merck), Isopropylalkohol (Merck), Formaldehyd (Merck), Ameisensäure (Merck), Milchsäure (Merck), Salzsäure (Merck), Cetylammmoniumbromid (Merck), Cetylpyridiniumchlorid (Merck), Alkylbenzyltrimethylammoniumchlorid (Merck), Tego 51 (Th. Goldschmidt), Tego diocto (Th. Goldschmidt). Außerdem wurde der Einfluß von Pepsin (Merck) und Trypsin (Merck) getestet.

3.2. Methodik

Im ersten Versuchsabschnitt wurde die zu testende Lösung dem enterotoxinhaltigen Kulturfiltrat bzw. dem in Aqua dest. gelösten Kulturfiltrat-Lyophilisat zugesetzt, dessen Enterotoxingehalt zuvor jeweils im MANCINI-Test bestimmt worden war. Nach der Vermischung von Kulturfiltrat und Desinfektionsmittel wurde der pH-Wert registriert, da sonst bei der Beurteilung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann, daß der Desinfektionsmitteleffekt nur pH-bedingt war. Aus den Werten für die serologische Aktivität des Kulturfiltrats vor und nach der Einwirkung des Desinfektionsmittels konnte abgelesen werden, ob und inwieweit es zu einer Inaktivierung des Enterotoxin B gekommen war. Um eine Beeinflussung des Nachweissystems seitens des Desinfektionsmittels oder des "Enthemmungsmittels" (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 1969), das zum "Stoppen" der Reaktion angesetzt wurde, auszuschließen, liefen außer positiven (Referenztoxin) und negativen (enterotoxinfreies PHP-Medium) Kontrollen auch Proben mit, die nur das Desinfektionsmittel oder das "Enthemmungsmittel" in den zur Anwendung kommenden Konzentrationen enthielten.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde aufgrund der im ersten Versuchsabschnitt erzielten Ergebnisse nur mit folgenden Desinfektionsmitteln der sog. "Toxinträgerversuch" durchgeführt: Natriumhypochlorit, Calciumhypochlorit, Chloramin T und Peressigsäure. Dabei wurden 1 cm² große Leinenlappchen 6 bis 12 Stunden lang in Kulturfiltrat-Lyophilisatlösung getränkt, luftgetrocknet und anschließend in je eine Petrischale gegeben. In jede Petrischale wurden je 10 ml Aqua dest. gegeben (vierfacher Ansatz), um anschließend unter gelegentlichem Umschütteln das Toxin weitgehend herauszulösen. Dann wurde der Toxingehalt im MANCINI-Test bestimmt. Zu weiteren Petrischalen, deren Zahl von der Versuchsanordnung abhängig war, wurden je 10 ml des betreffenden Desinfektionsmittels pipettiert. Nach gelegentlichem Umschütteln wurde nach 60 bzw. 120 min eine Probe entnommen, das jeweilige "Enthemmungsmittel" dazugegeben und die Restaktivität des herausgelösten Toxins bestimmt. Anschließend wurden die Leinen-

läppchen herausgenommen und mit 5 ml Aqua dest. gespült, um festzustellen, ob noch nach der Desinfektionsmitteleinwirkung Enterotoxin in den Läppchen vorhanden war.

3.2.1. Alkalien

3.2.1.1. Natronlauge

Von den verschiedenen als Desinfektionsmittel beschriebenen Alkalien wurde nur Natronlauge eingesetzt, und zwar als n-; 0,1 n- bzw. 0,01 n-Lösung. Zur Bestimmung der detoxifizierenden Aktivität wurden jeweils 18 ml der Natronlauge in einen Erlenmeyerkolben pipettiert und im Wasserbad auf 20, 40 bzw. 60 °C temperiert. Danach wurden jedem Kolben 2 ml Kulturfiltrat (75 mcg Enterotoxin/ml) zugesetzt und der pH-Wert bestimmt: Bei n NaOH pH 12,3, bei 0,1 n 12,2 und bei 0,01 n 11,4. Nach 30 bzw. 60 min wurde jedem Kolben eine Probe entnommen und die serologische Restaktivität bestimmt.

Ergänzend zu diesen Untersuchungen wurde geprüft, welche Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei der Inaktivierung des im Kulturfiltrat enthaltenen Enterotoxins B zukommt. Zu diesem Zweck wurden Natriumhydroxidplättchen in unterschiedlicher Menge so in Aqua dest. gelöst, daß wäßrige Lösungen im pH-Wertbereich von 11,6 bis 13,4 erhalten wurden, wobei die Abstände zwischen zwei Lösungen jeweils nur 0,1 pH betrugen. Von diesen Lösungen wurden jeweils 18 bzw. 2 ml in einen Erlenmeyerkolben pipettiert, auf 20 °C temperiert und jeweils mit 2 ml Kulturfiltrat (75 mcg/ml) vermischt. Nach einstündiger Einwirkungszeit wurde die serologische Restaktivität ermittelt.

3.2.2. Peroxide

3.2.2.1. Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Aufgrund orientierender Vorversuche wurden in den Hauptversuchen folgende H_2O_2 -Konzentrationen in ihrer Wirkung auf Kulturfiltrat (Toxingehalt: 75 mcg/ml) geprüft: 1 %, 3 %, 5 % bzw. 10 %. Außerdem wurde Kulturfiltrat mit 10 mcg Enterotoxin/ml mit 1 bzw. 3 %igem H_2O_2 versetzt. Die Mischungen H_2O_2 -Kulturfiltrat (20 °C)

im Verhältnis 9 : 1 lagen in einem pH-Bereich von 7,5 bis 8,5. Den nach 30 bzw. 60 min entnommenen Proben wurde eine äquivalente Menge Natriumthiosulfatlösung zugegeben, um die Reaktion zu "stoppen". Danach wurde die Restaktivität der Proben bestimmt.

3.2.2.2. Peressigsäure (PES)

Für die Prüfung der Wirkung der PES auf enterotoxinhaltige Kulturfiltrate wurden Gebrauchskonzentrationen gewählt, die im Bereich der mikrobiziden Wirkung der PES liegen: 0,1 % - 0,4 %. Geprüft wurden Kulturfiltrate mit Toxingehalten von 5 bzw. 30 mcg/ml. Die Mischungsverhältnisse PES : Kulturfiltrat (20 °C) waren 9 : 1. Die pH-Werte der Mischungen lagen im Bereich von 5 - 7. Nach einer Reaktionszeit von 30, 60 bzw. 120 min wurden Proben entnommen, mit einer äquivalenten Menge Cysteinhydrochlorid (SPRÖSSIG und MÜCKE, 1968) versetzt und im MANCINI-Test auf ihre Restaktivität untersucht.

Für den zweiten Versuchsabschnitt ("Toxinträgertest") wurden folgende Konzentrationen gewählt: 0,2 %, 0,4 %, 0,5 % bzw. 0,6 %-ige PES-Lösung.

3.2.2.3. Kaliumpermanganat (KMnO₄)

Es wurden 0,1 m, 0,01 m bzw. 0,001 m-Lösungen von KMnO₄ auf ihre inaktivierende Wirksamkeit geprüft. Das Mischungsverhältnis KMnO₄ : Kulturfiltrat belief sich auf 9 : 1. Der pH-Wert der Mischungen lag zwischen 7 und 8. Der Toxingehalt des Kulturfiltrats nach Zusatz des KMnO₄ war bei einer Versuchsreihe 4,5 mcg/ml, bei der anderen 38 mcg/ml. Nach 30 bzw. 60 min wurden die Reaktionen mit Natriumthiosulfatlösung "gestoppt" und die Restaktivität bestimmt.

3.2.3. Halogene

3.2.3.1. Natriumhypochlorit (NaOCl)

Es wurden folgende Konzentrationen von aktivem Chlor in ihrer Wirkung

auf das Enterotoxin B enthaltende Kulturfiltrat (Toxingehalt: 60 mcg/ml) geprüft: 30, 40, 50 bzw. 60 ppm. Die pH-Werte der NaOCl-Kulturfiltratgemische (9 : 1) lagen im Bereich von pH 7,5 - 8 und hatten eine Temperatur von 20 °C. Nach 30, 60 bzw. 120 min wurden Proben entnommen. Diese wurden zum "Stoppen" der Reaktion mit Natriumthiosulfatlösung (DGHM, 1969) versetzt, bevor die serologische Restaktivität bestimmt wurde.

Im zweiten Versuchsabschnitt ("Toxinträgerversuch") wurden folgende Konzentrationen geprüft: 40 - 80 ppm im Abstand von jeweils 10 ppm.

3.2.3.2. Calziumhypochlorit (Ca(OCl)₂)

Für die Versuche mit Calziumhypochlorit wurden folgende Konzentrationen an freiem Chlor gewählt: 20 bis 80 ppm. Das mit Aqua dest. rekonstituierte Enterotoxin-Kulturfiltrat (Toxingehalt: 260 mcg/ml) wurde 30, 60 bzw. 120 min der Einwirkung des Calziumhypochlorits bei 20 °C ausgesetzt. Das Mischungsverhältnis Desinfektionsmittel zu Kulturfiltrat war 9 : 1, der pH-Wert der Mischung lag bei 9. Als "Reaktionsstopper" diente Natriumthiosulfatlösung (DGHM, 1969).

Im "Toxinträgerversuch" wurden (wie bei NaOCl) folgende Konzentrationen getestet: 40 - 80 ppm.

3.2.3.3. Chloramin T

Folgende Konzentrationen des Chloramin T wurden in die Versuche miteinbezogen: 0,001 m, 0,01 m bzw. 0,1 m-Lösung. 18 ml Chloramin T-Lösung der oben genannten Konzentrationen wirkten 15, 30, 60 bzw. 120 min bei 20 °C auf rekonstituiertes enterotoxinhaltiges Kulturfiltrat-Lyophilisat (2 ml mit 100 mcg/ml) ein. Der pH-Wert der Mischungen war ca. 7,5. Die Reaktion wurde mit Natriumthiosulfatlösung (DGHM, 1969) "gestoppt" und anschließend die Restaktivität bestimmt. Danach wurden entsprechende Versuche mit in Aqua dest. rekonstituiertem Kulturfiltrat-Lyophilisat (410 mcg/ml) durchgeführt.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurden Konzentrationen von 40, 50... 80 ppm 60 bzw. 120 min getestet ("Toxinträgerversuch").

3.2.3.4. Jodophor

1, 5 bzw. 10 %ige Lösungen des Jodophor wurden auf ihre das Kulturfiltrat inaktivierende Wirkung getestet. Das Kulturfiltrat enthielt 60 mcg/ml Toxin. Das Mischungsverhältnis Desinfektionsmittel zu Kulturfiltrat war 9 : 1. Die Reaktion dauerte 60 bzw. 360 min. Die pH-Werte lagen bei 5.

3.2.4. Alkohole

3.2.4.1. Äthylalkohol

Geprüft auf seine das Staphylokokkenenterotoxin B inaktivierende Wirkung wurde Äthylalkohol. Dieser wurde aus 96 %igem Alkohol hergestellt und mit Wasser so verdünnt, daß seine Endkonzentration in der Kulturfiltrat-Alkoholmischung 70 % betrug. Er wirkte auf 50 mcg Enterotoxin/ml enthaltendes Kulturfiltrat (Mischungsverhältnis 9 : 1) 30, 60 bzw. 120 min bei 20 °C ein. Die pH-Werte der Alkohol-Kulturfiltratmischung lagen bei 8.

3.2.4.2. Isopropylalkohol

Für die Versuche mit Isopropylalkohol wurde die gleiche Versuchsanordnung wie beim Äthylalkohol gewählt.

3.2.5. Aldehyde

3.2.5.1. Formaldehyd

Zu den Detoxifizierungsversuchen wurden 1, 5 bzw. 10 %ige Lösungen von Formaldehyd sowie Formaldehyd solutus (Formalin, 35 %ige Konzentration) verwendet. Das Kulturfiltrat enthielt 25 bzw. 75 mcg/ml Enterotoxin. Das Mischungsverhältnis Desinfektionsmittel zu Filtrat lautete 9 : 1. Der pH-Wert (bei 20 °C) wurde nach Reaktionsbeginn bei der geringeren Enterotoxinkonzentration mit HCl auf 6,0 bzw. bei der größeren mit NaOH auf 9,0 eingestellt. Nach 30, 60 bzw. 120 min wurden Proben entnommen und auf die Abnahme der serologischen Aktivität geprüft.

3.2.6. Säuren

3.2.6.1. Ameisensäure

Aufgrund orientierender Vorversuche wurden in den Hauptversuchen folgende Konzentrationen in ihrer Wirkung auf das ungereinigte Enterotoxin B (Kulturfiltrat mit 50 mcg/ml, rekonstituiertes Kulturfiltrat mit 450 mcg/ml) geprüft: 2, 3, 4 bzw. 5 %. Nach 30 bzw. 60 min Einwirkungsdauer bei 20 °C wurde den Proben (Ameisensäure-Kulturfiltrat im Verhältnis 9 : 1), deren pH-Wert bei 3 - 4 lag, n NaOH-Lösung bis zur Neutralisation zugefügt und anschließend die Restaktivität des Kulturfiltrats bestimmt.

3.2.6.2. Milchsäure

5, 10 bzw. 20 %ige Milchsäure wurde in ihrer Wirkung auf die serologische Aktivität des Enterotoxin B enthaltenden Kulturfiltrats (35 mcg/ml bzw. 31 mcg/ml) getestet. Das Mischungsverhältnis Milchsäure - Kulturfiltrat war 9 : 1, der pH-Wert der Mischungen (bei 20 °C) lag im Bereich von 3 - 4. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem der Ameisensäure.

3.2.6.3. Salzsäure (HCl)

Ergänzend zu obigen Untersuchungen wurde geprüft, welche Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei der Inaktivierung des im Kulturfiltrat enthaltenen Enterotoxins B zukommt. Zu diesem Zweck wurde n HCl mit Aqua dest. so verdünnt, daß wäßrige Lösungen im pH-Bereich von 0,1 - 3,0 erhalten wurden. Dabei wurden die Abstände zwischen zwei Lösungen stets so gewählt, daß sie im Bereich von pH 0,1 - 2,0 jeweils nur 0,1 betrug. Von diesen Lösungen wurden - ähnlich wie bei der Prüfung der Wasserstoffionenkonzentration im alkalischen Bereich von pH 11,6 - 13,4 - jeweils 18 bzw. 2 ml in einen Erlenmeyerkolben pipettiert, auf 20 °C temperiert und jeweils mit 2 ml Kulturfiltrat (75 mcg/ml) vermischt. Nach einstündiger Einwirkungszeit wurde die serologische Restaktivität ermittelt.

3.2.7. Phenole

3.2.7.1. Trichlorphenol

Das Trichlorphenol wurde als 0,1 m, 0,05 m bzw. 0,01 m-Lösung in die Versuche miteinbezogen. Seine Wirkung auf das 50 mcg/ml Enterotoxin enthaltende Kulturfiltrat (Mischungsverhältnis 9 : 1) wurde nach 30 bzw. 60 min bei 20 °C überprüft. Der pH-Wert der Mischungen lag zwischen 3,5 und 4,5. Die Reaktionen wurden mit Tween 80 (DGHM, 1969) "gestoppt".

3.2.8. Oberflächenaktive Verbindungen

3.2.8.1. Kationenaktive Verbindungen

Folgende drei kationenaktive Verbindungen wurden geprüft: Cetylammmoniumbromid, Alkylbenzyltrimethylammoniumchlorid und Cetylpyridiniumchlorid.

Cetylammmoniumbromid: 0,01 m-Lösungen wurden in die Versuche zur Feststellung der Inaktivierung des Enterotoxin-Kulturfiltrats (Toxingehalt: 100 mcg/ml) einbezogen. Das Verhältnis Desinfektionsmittel zu Toxin war 9 : 1. Der pH-Wert der Mischungen lag im Bereich 4,5. Die Einwirkungszeit war 30, 60 bzw. 120 min. Vor der Bestimmung der serologischen Aktivität wurde die Reaktion mit Tween 80 (DGHM, 1969) "gestoppt".

Alkylbenzyltrimethylammoniumchlorid: Zu den Versuchen wurden ebenfalls 0,01 m-Lösungen herangezogen. Der Toxingehalt des Kulturfiltrats betrug 60 mcg/ml. Der pH-Wert der Mischungen (20 °C, 9 Teile Desinfektionsmittel und 1 Teil Kulturfiltrat) lag zwischen 7,5 und 8. Die Einwirkungszeit war 30, 60 bzw. 120 min.

Cetylpyridiniumchlorid: Die Konzentrationen für Lösungen waren 0,01 m, 0,05 m bzw. 0,1 m. Der Toxingehalt des Kulturfiltrats betrug 50 mcg/ml. Nach 30 bzw. 60 min Reaktionszeit (20 °C, Verhältnis Desinfektionsmittel zu Kulturfiltrat 9 : 1, pH-Wert ca. 5) und "Stoppen" der Reaktion wurde die Restaktivität bestimmt.

3.2.8.2. Amphotenside

Aus der Gruppe der Amphotenside wurden Tego 51 bzw. Tego diocto in folgenden Konzentrationen auf ihre Wirkung als Mittel zur Inaktivierung von Enterotoxin B geprüft: 0,5, 1, 1,5, 2 bzw. 2,5 %. Das Kulturfiltrat hatte einen Toxingehalt von 60 mcg/ml. Der pH-Wert der Mischungen (9 : 1) lag bei 8. Die Einwirkungs-dauer betrug aufgrund von Vorversuchen 12 Stunden bei Tego 51 bzw. 1 und 6 Stunden bei Tego diocto.

3.2.9. Proteolytische Enzyme

3.2.9.1. Pepsin

Pepsin in einer Konzentration von 50 mg/ml wurde in seiner Wirkung auf das Kulturfiltrat (Toxingehalt 50 bzw. 200 mcg/ml) geprüft. Der pH-Wert der Mischungen (9 Teile Pepsin und 1 Teil Kulturfiltrat) lag bei 4,7. Die Einwirkungs-dauer bei 20 °C betrug 6 Stunden.

3.2.9.2. Trypsin

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen des Pepsins.

3.2.10. Nachweisverfahren

Der Nachweis von Enterotoxin B erfolgte bei den unbehandelten wie auch den einer Einwirkung unterworfenen Kulturfiltraten qualitativ und semiquantitativ mit dem OUCHTERLONY-Test in Anlehnung an das von SOMMERFELD und TERPLAN (1975) beschriebene Verfahren bzw. quantitativ mit dem von MANCINI u.a. (1965) entwickelten Verfahren der einfachen radialen Immunodiffusion. Da von jeder Probe mindestens vier Ansätze vorgenommen wurden, stellen die Ergebnisse des MANCINI-Tests Mittelwerte von Mehrfachbestimmungen dar.

3.2.10.1. OUCHTERLONY-Test (Radiale Doppeldiffusion)

Dieses Nachweisverfahren wurde zuerst von OUCHTERLONY (1948) be-

schrieben. Der Test beruht darauf, daß Antigen und Antikörper vom jeweiligen Reservoir aus radiär in ein Gel diffundieren. Treffen Antigen und homologer Antikörper aufeinander, bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, der als Präzipitationslinie sichtbar wird.

Für die eigenen Versuche wurde die modifizierte Methode nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) angewandt. Mit 10 ml eines verflüssigten 1 %igen Agarosegels (0,02 m Barbitalpuffer mit Zusatz von 1 % Polyäthylenglykol 2000, pH 8,4) wurden in einem Guß drei Objektträger, die in einen Rahmen (LKB-Immunophor-Ausrüstung) eingelegt waren, beschichtet. Aus der 2 mm hohen Gelschicht wurden nach dem Erstarren mit einer Stanzform Löcher in der gewünschten Anordnung ausgestanzt und mit jeweils 7 µl Kulturfiltrat oder Enterotoxin B bzw. Antiserum B (Serva) randvoll gefüllt. Nach einer Reaktionszeit von 18 bzw. 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37 °C wurden die Platten unter feuchten Filterpapierstreifen bei 37 bis 50 °C getrocknet (3 - 4 Stunden). Die Färbung (3 - 5 min) erfolgte mit 0,5 % Coomassie-Brillant-Blau, gelöst in Wasser, Eisessig (10 %) und Methanol (45 %). Nach dem Entfärben (5 - 10 min) in einer Lösung, die 250 ml Methanol, 100 ml Eisessig und 450 ml Aqua dest. enthält, wurden die Platten ca. 15 min im Brutschrank getrocknet, bevor sie ausgewertet wurden.

Da sich nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) das diagonale Lochmuster zur halbquantitativen Feststellung von Toxingehalten empfiehlt, wurde diese Anordnung gewählt. Die Löcher der mittleren Reihe enthalten dabei alle Antiseren derselben Konzentration. Werden zwei Löcher der oberen bzw. unteren Reihe - in der Regel jeweils das mittlere - mit Referenztoxin bekannter Konzentration beschickt, können auf einem Objektträger maximal acht Proben qualitativ oder ein bzw. zwei Verdünnungsreihen einer bzw. zweier Proben mit unbekanntem Toxingehalt qualitativ und semiquantitativ untersucht werden.

Die qualitative Aussage beruht auf dem Vorliegen einer Koaleszenz der Präzipitationslinien von Referenztoxin und Proben. Die semiquantitative Auswertung erfolgte durch direkten Vergleich der

Intensität des Referenzpräzipitates mit der der Präzipitationslinien der einzelnen Verdünnungsstufen. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 0,1 mcg/ml Enterotoxin B.

3.2.10.2. MANCINI-Test (einfache radiale Immundiffusion)

Für dieses von MANCINI u.a. (1965) entwickelte quantitative Verfahren wurden 7,25 ml auf 50 °C abgekühlter Agarose (0,02 m Barbitalpuffer ohne Polyäthylenglykol, pH 7,4) mit 0,25 ml Antiserum B (eigene Produktion) vermischt. Dieses homogene Gemisch reichte zur Beschichtung eines Objektträgers (7,5 cm x 5,2 cm), der in einen entsprechenden Rahmen eingelegt war (Nivelliertisch). Nach Erstarrung des Agarosegels konnten die Platten in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei der beschriebenen Lagerung waren MANCINI-Platten noch nach zehn Tagen ohne Einschränkung der Antiserumaktivität zu verwenden.

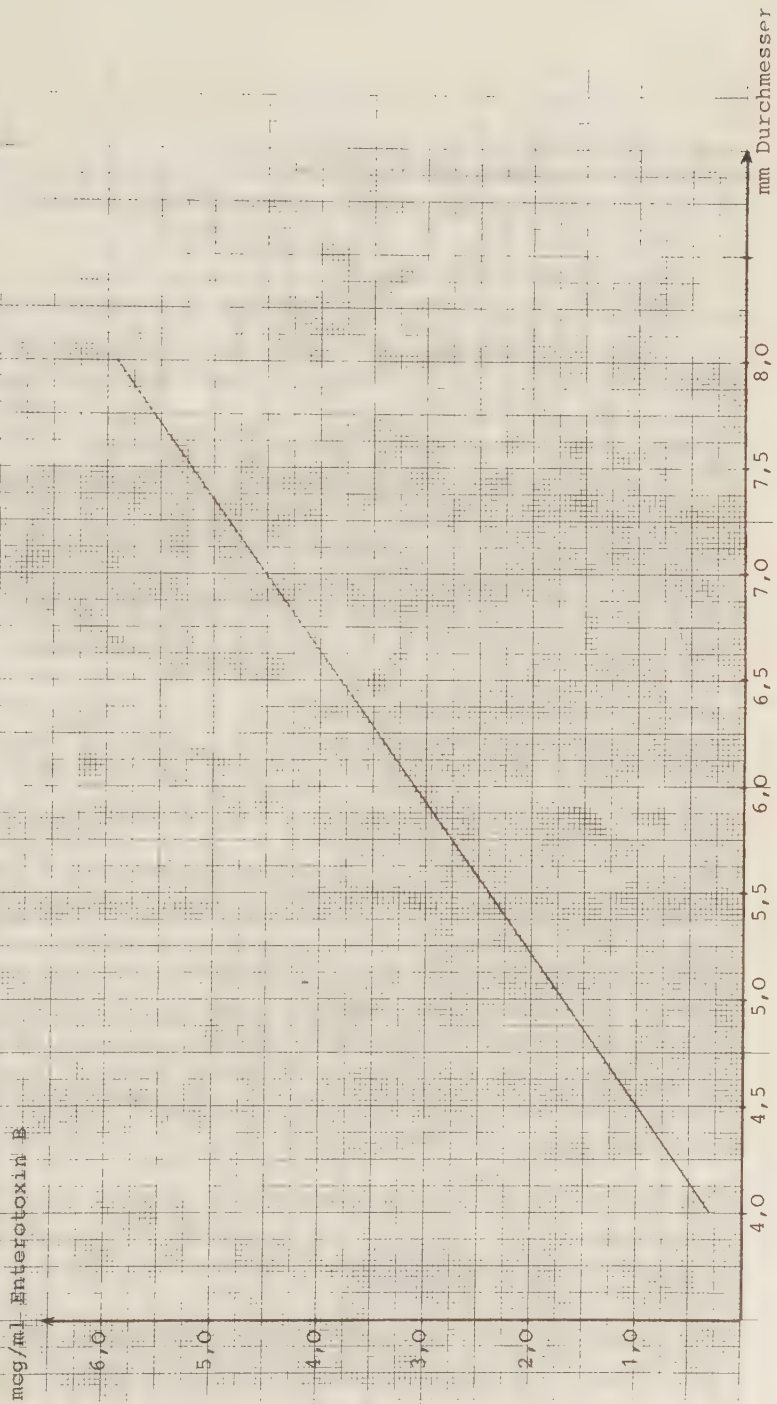
In die erstarrte, 2 mm dicke Gelschicht wurden je nach erwartetem Toxingehalt 14 bis 24 Löcher gestanzt. Von den randvoll gefüllten (7 µl) Probelöchern aus diffundieren die Toxinmoleküle radial in die Gelschicht und bilden ringförmige Präzipitate. Bei den eigenen Versuchen wurde eine Reaktionszeit von 18 Stunden gewählt (feuchte Kammer, Zimmertemperatur, Nivelliertisch). Nach Trocknen, Färben und Entfärben - wie im OUCHTERLONY-Test - wurden die Durchmesser der Präzipitate ausgemessen, deren Grundfläche proportional der Toxinkonzentration ist.

In Vorversuchen wurden die Präzipitate von hochgereinigtem Enterotoxin B (Serva) verschiedener Konzentrationen ausgemessen, das einerseits in physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurde, andererseits in 4 %igem PHP-Medium. Da sich die Präzipitatz Durchmesser für Toxinkonzentrationen über 2 mcg/ml nicht deckten, wurde die endgültige Eichkurve anhand von Kulturfiltratverdünnungsreihen aufgestellt.

Nach Abschätzung der Enterotoxinkonzentration eines Kulturfiltrats anhand einer Eichkurve für in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Enterotoxin wurde es so verdünnt, daß Enterotoxin B etwa in folgenden errechneten Endkonzentrationen zu erwarten war:

0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4 bzw. 1,5 mcg/ml. Im vierfachen Ansatz wurden die Präzipitationsdurchmesser dieser geschätzten Konzentrationen mit dem des Referenztoxins (1,0 mcg Enterotoxin B/ml) verglichen. Durch Interpolieren wurde dann die tatsächliche Toxinkonzentration des Kulturfiltrats ermittelt. Durch Verdünnen dieses Kulturfiltrats bekannter Enterotoxinkonzentration mit physiologischer Kochsalzlösung wurden mehrere Verdünnungsreihen angelegt, insbesondere von 5 bis 0,15 mcg/ml. Im Bereich von 0,5 bis 5 mcg/ml Enterotoxin B war eine gute Übereinstimmung von Durchmesser der Präzipitate und Toxinkonzentration gegeben. Für Toxinkonzentrationen über 5,0 mcg/ml wurde der Diffusionsendpunkt innerhalb der Reaktionszeit nicht erreicht. (SIMON, 1976). Während der Nachweis bei 0,4 mcg Enterotoxin/ml noch deutlich positiv verlief, war er bei Konzentrationen von 0,35 bis 0,25 mcg/ml nur schwach positiv (fraglich). Proben mit weniger als 0,25 mcg/ml wurden nicht erfaßt. Anhand der bei diesen Versuchen erzielten Werte wurde eine Eichkurve (Abb. 1) erstellt, mittels derer die Enterotoxinmengen/ml in den verschiedenen Versuchsreihen bestimmt wurden. Da bei jeder Platte vier Referenztoxinproben (1 mcg/ml) als interner Standard mitliefen, konnten plattenabhängige Unterschiede ausgeschaltet werden.

Abb. 1: Eichkurve zur Bestimmung des Gehaltes an Enterotoxin B (mcg/ml) im Kulturfiltrat



3.3. E r g e b n i s s e

3.3.1. Alkalien

3.3.1.1. Natronlauge

Die n-Lösung hatte das enterotoxinhaltige Kulturfiltrat bei 20 °C schon nach 30 min (nach dem ersten Beobachtungszeitpunkt) inaktiviert (Tab. 1). Auch bei 40 °C und 60 °C wurde eine vollständige Inaktivierung erreicht. Die 0,1 n-Lösung hatte bei 20 °C keinen großen Einfluß auf die Toxinabnahme (ca. 30 %), jedoch fiel die Restaktivität bei gleichzeitiger Erwärmung auf 40 °C und 60 °C rasch ab. Bei 60 °C wurde bereits nach 30 minütiger Einwirkung kein Enterotoxin mehr nachgewiesen. Die 0,01 n-Natronlauge inaktivierte nur bei 60 °C (30 und 60 min Reaktionszeit) das Enterotoxin im Kulturfiltrat vollständig. Bei 20 °C bzw. 40 °C zeigte sich nur ein geringer Einfluß auf die Abnahme der serologischen Aktivität.

Hinsichtlich des Einflusses der Wasserstoffionenkonzentration einer wäßrigen Lösung von NaOH auf die Inaktivierungsrate des Enterotoxins im pH-Bereich von 9,0 bis 13,3 wurden die in Tabelle 2 auszugsweise wiedergegebenen Resultate registriert. Daraus geht hervor, daß die bei pH 9,0 noch 90 % betragende Restaktivität mit steigendem pH-Wert kontinuierlich abnahm. Auffällig war der besonders stark ausgeprägte Rückgang der Restaktivität von ca. 60 % auf ca. 25 % im Bereich von pH 12,8 bis pH 13,3. Bei einem Mischungsverhältnis von 1 : 1 für alkalische wäßrige Lösung und Kulturfiltrat wurde keine Inaktivierung des Enterotoxins beobachtet. Der pH-Wert des Gemisches betrug selbst nach Zugabe der stärksten alkalischen Lösung (pH 13,4) zu dem Kulturfiltrat (pH 7,4) 10,2.

3.3.2. Peroxide

3.3.2.1. Wasserstoffperoxid

Bei Zusatz von H_2O_2 zum enterotoxinhaltigen Kulturfiltrat (Endkonzentration 7,5 mcg/ml) ließ sich eine dosis- und zeitabhängige

Wirkung des Desinfektionsmittels feststellen (Tab. 3). Die Inaktivierungsrate war bei der höchsten geprüften Endkonzentration (9 %) mit 48 % deutlich stärker ausgeprägt als bei der zehnfach geringeren Konzentration mit 25 %. Der Einfluß der Einwirkungszeit (30 bzw. 60 min) war nicht so stark ausgeprägt. In den Kulturfiltraten mit nur 1 mcg Enterotoxin/ml Endkonzentration war die serologische Restaktivität nach Einwirkung von H_2O_2 unter sonst vergleichbaren Bedingungen (Anwendungskonzentration, Einwirkungszeit) erheblich geringer als bei der höheren Enterotoxinkonzentration.

3.3.2.2. Peressigsäure

Zur Prüfung des Effektes der Peressigsäure auf ungereinigtes Enterotoxin B wurden Proben mit 5 bzw. 30 mcg Enterotoxin/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen des Desinfektionsmittels versetzt. Dabei zeigte sich, daß der Grad der Inaktivierung des Enterotoxins von den Veränderlichen Konzentration der PES, Einwirkungszeit der PES und Enterotoxinausgangskonzentration beeinflußt wurde. In mit 9 Teilen PES vermischten Kulturfiltraten (5 mcg Enterotoxin/ml) war bereits nach 30 min Einwirkungszeit des Desinfektionsmittels mit einer Ausgangskonzentration von 0,3 bzw. 0,4 % kein Enterotoxin mehr serologisch nachweisbar (Tab. 4), während bei den beiden schwächeren PES-Konzentrationen auch nach 2 Stunden noch keine vollständige Inaktivierung erzielt wurde. Die Verlängerung der Einwirkungszeit von 60 auf 120 min erbrachte keine ins Gewicht fallende zusätzliche Inaktivierungsrate. Die bei den Proben mit 30 mcg Enterotoxin/ml erzielten Ergebnisse waren in der Tendenz ähnlich.

Im zweiten Versuchsabschnitt ("Toxinträgerversuch") wurden zuerst mit Kulturfiltrat getränkte und anschließend an der Luft getrocknete Leinenlappchen in je 10 ml Aqua dest. gewässert, um das Enterotoxin herauszulösen. Der Toxingehalt dieser Lösung betrug durchschnittlich 26 mcg/ml. Anschließend wurde bei anderen Leinenlappchen statt des Aqua dest. PES in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Nach einer Einwirkungszeit von 60 bzw. 120 min und "Stoppen" der Reaktion in o.a. Weise war kein Enterotoxin mehr

nachweisbar, wenn die PES-Konzentration sich auf 0,6 bzw. 0,5 % belief. In dem anschließend mit 5 ml Aqua dest. durchgeführten Waschen der Leinenlappchen konnte in den beiden erwähnten Fällen kein Enterotoxin gefunden werden.

3.3.2.3. Kaliumpermanganat

Nach 30-minütiger Einwirkung von 0,1 m KMnO_4 -Lösung (9 Teile) auf Kulturfiltrat mit 45 mcg Enterotoxin/ml (1 Teil) war kein Enterotoxin mehr mit dem MANCINI-Test nachweisbar (Tab. 5) Bei Zusatz der 0,01 m KMnO_4 -Lösung betrug die Restaktivität 11 %, bei der 0,001 m Lösung 17 %. Wenn KMnO_4 in gleichen Konzentrationen und Mengenverhältnissen auf mit Aqua dest. rekonstituiertes Kulturfiltrat-Lyophilisat (Enterotoxinausgangskonzentration 380 mcg/ml) einwirkte, war ebenfalls nur bei den beiden schwächeren KMnO_4 -Konzentrationen Enterotoxin B zu finden (15 bzw. 32 %), nicht aber wiederum bei der 0,1 m Lösung. Durch Ausdehnung der Einwirkungszeit auf 60 min konnte Enterotoxin B zwar nicht vollständig inaktiviert werden, doch sank der prozentuale Anteil der Restaktivität auf 6 % (0,01 m KMnO_4) bzw. 21 % (0,001 m KMnO_4).

3.3.3. Halogene

3.3.3.1. Natriumhypochlorit

Die Wirkung von Natriumhypochlorit auf das Rohtoxin war ebenfalls dosis- und zeitabhängig (Tab. 6). So wurde ein vollständiger serologischer Aktivitätsverlust sowohl durch Verlängerung der Einwirkungszeit auf 120 min (z.B. bei Anwendungskonzentration von 30 bzw. 40 ppm aktivem Chlor), als auch durch Erhöhung der Konzentration auf 50 bzw. 60 ppm erreicht (Inaktivierung bereits nach 60 min). Nach 30 min war bei allen geprüften Konzentrationen jedoch nur eine geringe Aktivitätsabnahme (5 bis 30 %) festzustellen. Bei Konzentrationen über 60 ppm war das Rohenterotoxin nach 30 min nicht mehr serologisch nachweisbar.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde das aus den Leinenlappchen mit 10 ml herausgelöste Toxin (26 mcg/ml) nach 60 min durch 80 ppm aktives Chlor, nach 120 min durch 50 ppm inaktiviert.

3.3.3.2. Calciumhypochlorit

Die erzielten Ergebnisse waren in der Tendenz ähnlich wie beim NaOCl. Nach 30 min Einwirkungsdauer erreichte man mit mindestens 70 ppm aktivem Chlor eine totale Inaktivierung des Toxins bei 30 bzw. 40 ppm betrug die Inaktivierungsrate 95 bzw. 96 %. Auch nach 60 min konnte mit 30 und 40 ppm aktivem Chlor keine vollständige Detoxifizierung erreicht werden. Erst nach Ausdehnung der Einwirkungszeit auf 120 min konnte bei diesen Konzentrationen keine Reaktion im serologischen Test mehr beobachtet werden. „

Beim "Toxinträgerversuch" erzielte man mit 80 ppm nach 60 min eine serologische Inaktivierung des aus den Leinenläppchen herausgelösten Toxins (Toxingehalt 26,8 mcg/ml). Nach 120 min waren bereits 50 ppm aktives Chlor von gleicher Wirksamkeit „

3.3.3.3. Chloramin T

In der ersten Versuchsreihe wirkte Chloramin T in 0,1 m, 0,01 m bzw. 0,001 m-Lösung 15, 30, 60 bzw. 120 min auf enterotoxinhaltiges Kulturfiltrat (Toxingehalt 10 mcg/ml) ein. Im serologischen Test konnte in keinem Fall Toxin mehr nachgewiesen werden. Reagierte Chloramin T in diesen drei Konzentrationen mit Kulturfiltrat mit einem Toxingehalt von 41 mcg/ml 30 bzw. 60 min, war noch eine geringe Restaktivität (10 bis 1 %) vorhanden, nach Verlängerung der Reaktionszeit auf 120 min detoxifizierte das Chloramin T das Enterotoxin B vollständig.

Beim "Toxinträgerversuch" konnte das herausgelöste Enterotoxin (26 mcg/ml) mit 70 ppm Chloramin T nach 60 min inaktiviert werden. Nach 120 min konnte schon nach Einwirkung von 40 ppm kein Toxin mehr serologisch nachgewiesen werden.

3.3.3.4. Jodophor

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich wird, wurde der Toxingehalt des Kulturfiltrats durch das Jodophor nur geringgradig reduziert. Selbst nach sechsstündiger Einwirkungsdauer betrug die Restaktivität der höchsten geprüften Konzentration 65 %.

3.3.4. Alkohole

3.3.4.1. Äthylalkohol

Nach Zusatz von 77 %igem Äthylalkohol zum enterotoxinhaltigen Kulturfiltrat (Toxingehalt 5 mcg/ml) ließ sich folgendes feststellen: Entnimmt man die Proben zur Toxinbestimmung von der Oberfläche des Gemisches, so weist man im Test wenig Toxin nach; entnimmt man die Proben vom Boden des Reaktionsgefäßes, so läßt sich darin keine Abnahme der serologischen Aktivität nachweisen. Der Äthylalkohol hatte das Toxin aus der Lösung teilweise ausgefällt, aber nicht inaktiviert.

3.3.4.2. Isopropylalkohol

Die Versuche, die analog denen mit Äthylalkohol aufgeführt wurden, ergaben keine Abnahme des Enterotoxingehaltes im serologischen Test.

3.3.5. Aldehyde

3.3.5.1. Formaldehyd

Formaldehyd in 1 - 35 %iger Lösung, eingestellt auf pH 6,0, wirkte auf enterotoxinhaltiges Kulturfiltrat (25 mcg/ml) 30, 60 bzw. 120 min ein. Im MANCINI-Test konnte kein serologischer Aktivitätsverlust festgestellt werden. Es fiel jedoch auf, daß die Präzipitate nur schwach ausgeprägt waren. In einer zweiten Versuchsreihe, bei der der pH-Wert auf 9,0 eingestellt wurde, konnte wiederum keine serologische Aktivitätsabnahme registriert werden.

3.3.6. Säuren

3.3.6.1. Ameisensäure

Bei Zusatz von Ameisensäure zum enterotoxinhaltigen Kulturfiltrat ließ sich eine vor allem dosisabhängige Wirkung des Desinfektionsmittels feststellen (Tab. 8). Außerdem hat auch die Einwirkungs-

zeit Einfluß auf die Inaktivierungsrate. In den Kulturfiltraten mit 45 mcg/ml Toxin war die serologische Restaktivität nach Einwirkung von Ameisensäure unter sonst vergleichbaren Bedingungen (Anwendungskonzentration, Einwirkungszeit) erheblich geringer als bei der niedrigeren Toxinkonzentration.

3.3.6.2. Milchsäure

Bei Zusatz von 9 Teilen 20 %iger Milchsäure zum Kulturfiltrat (Toxinendkonzentration 31 mcg/ml) wurde die Aktivität des Toxins um ca. 80 % reduziert. Die Inaktivierungsraten bei 10- bzw. 5 %iger Milchsäure belief sich auf ca. 70 % bzw. auf ca. 60 %. Ein Zusammenhang zwischen Einwirkungsdauer (30 bis 120 min) und serologischer Restaktivität des Enterotoxins ließ sich nicht feststellen.

3.3.6.3. Salzsäure

Die Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses einer wäßrigen Lösung mit einer Wasserstoffionenkonzentration im Bereich von pH 0,1 bis 3,0 auf die Inaktivierungsrate des Enterotoxins B sind in der Tabelle 9 auszugsweise wiedergegeben. Es fällt auf, daß die Restaktivität nach einem anfänglich großen Sprung stetig von 39 bis 92 % zunahm. Bei einem Mischungsverhältnis von 1 : 1 (statt 9 : 1) für wäßrige Lösung und Kulturfiltrat wurde keine Inaktivierung des Enterotoxins mehr beobachtet, obwohl z.B. bei Zugabe wäßriger Lösung mit pH 0,7 bzw. 1,0 ein End-pH-Wert von 3,1 bzw. 5,4 zu messen war.

3.3.7. Phenole

3.3.7.1. Trichlorphenol

Bei Zusatz von Trichlorphenol zum enterotoxinhaltigen Kulturfiltrat ließ sich feststellen, daß die serologisch bestimmte Restaktivität nach 30-minütiger Einwirkung bei allen drei getesteten Konzentrationen (0,01 m, 0,05 m bzw. 0,1 m-Lösung) ca. 60 % betrug. Erst bei Verlängerung der Einwirkungsdauer auf 60 min waren deutliche Unterschiede feststellbar. Während bei

der schwächsten Konzentration keine weitere Abnahme der Restaktivität zu beobachten war, fiel sie bei Zusatz von 0,05 m-Lösung auf ca. 55 % und bei der stärksten Konzentration sogar auf 45 %.

3.3.8. Oberflächenaktive Verbindungen

3.3.8.1. Kationenaktive Verbindungen

Die Ergebnisse der Versuche zur Ermittlung des Einflusses von, quaternären Ammonium- bzw. Pyridiniumverbindungen auf Rohenterotoxin B sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß das Cetylammmoniumbromid bei gleicher Konzentration mit ca. 55 % eine geringere Inaktivierungsrate bedingte als das Alkylbenzyl-dimethylammoniumchlorid (65 bis 70 %). Allerdings war bei der erstgenannten Substanz auch die Enterotoxinkonzentration mit 10 gegenüber 6 mcg/ml etwas höher. Während die Einwirkungszeit (30, 60 bzw. 120 min) beim Cetylammmoniumbromid offensichtlich ohne Einfluß war, war beim Alkylbenzyl-dimethylammoniumchlorid der nach 120 min registrierte Wert etwas geringer als der zu den beiden anderen Beobachtungszeitpunkten. Bei der Testung von Cetylpyridiniumchlorid zeigte sich, daß zwar die Einwirkungszeit (30 bzw. 60 min) ohne Einfluß auf den Grad der Inaktivierung blieb, andererseits aber bei einer Endkonzentration von 0,09 m die Aktivität erheblich stärker reduziert wurde als bei einer Endkonzentration von 0,045 m bzw. 0,009 m.

3.3.8.2. Amphotenside

Der Einfluß der Konzentrationen von Tego 51 bzw. Tego diocto auf die Inaktivierungsrate von Rohenterotoxin B war relativ gering (Tab. 11). Eine Erhöhung der Konzentration um das fünffache (von 0,45 % auf 2,25 %) hatte eine zusätzliche Abnahme der Restaktivität von 16 % bei Tego 51 bzw. von 17 % bei Tego diocto zur Folge. Bei Tego diocto war durch Verlängerung der Einwirkungsdauer von einer auf sechs Stunden keine weitere Aktivitätsabnahme zu erzielen.

3.3.9. Proteolytische Enzyme

3.3.9.1. Pepsin

Eine Wirkung von Pepsin in einer Konzentration von 50 mg/ml auf das enterotoxinhaltige Kulturfiltrat war auch nach sechsstündiger Einwirkungsdauer bei 20 °C nicht zu ermitteln.

3.3.9.2. Trypsin

Auch bei Trypsin konnte innerhalb einer sechsstündigen Reaktionsdauer kein das Enterotoxin inaktivierender Einfluß festgestellt werden.

Tabelle 1: Einfluß von Natronlauge auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B
(Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration	End- konzentration (n)	Einwirkungs- zeit (min)	Einwirkungs- temperatur (°C)	Enterotoxin- gehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
0,01		30	20		100
0,01		30	40		97
0,01		30	60		0
0,01	0,009	60	20	7,5	78
0,01		60	40		68
0,01		60	60		0
0,1		30	20		69
0,1		30	40		29
0,1		30	60		0
0,1	0,09	60	20	7,5	68
0,1		60	40		0
0,1		60	60		0
1		30	20		0
1		30	40		0
1		30	60		0
1	0,9	60	20	7,5	0
1		60	40		0
1		60	60		0

Tabelle 2: Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Natronlauge	pH	Mischung	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
11,6		9,0			90
12,0		9,2			83
12,5		9,3			78
13,0		11,9	60	7,5	68
13,1		12,5			62
13,2		12,8			58
13,3		13,1			26
13,4		13,3			26

Tabelle 3: Einfluß von Wasserstoffperoxid auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration (%)	End- konzentration (%)	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
1	0,9	30	7,5	80
		60		75
3	2,7	30	7,5	75
		60		67
5	4,5	60	7,5	57
		60		52
10	9	60	7,5	52
1	0,9	30	1	60
		60		40
3	2,7	30	1	40
		60		40

Tabelle 4: Einfluß der Peressigsäure auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration	End- konzentration (%)	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
0,1		30		58
0,1	0,09	60	5	36
0,1		120		36
0,2		30		20
0,2	0,18	60	5	16
0,2		120		10
0,3		30		0
0,3	0,27	60	5	0
0,3		120		0
0,4		30		0
0,4	0,36	60	5	0
0,4		120		0
0,3		60		2
0,3	0,27	120	30	0
0,4		60		0
0,4	0,36	120	30	0

Tabelle 5: Einfluß von Kaliumpermanganat auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration	End- (m)	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
0,001		30	4,5	17
0,001	0,0009	30	38	32
0,001		60	38	21
0,01		30	4,5	11
0,01	0,009	30	38	15
0,01		60	38	6
0,1		30	4,5	0
0,1	0,09	30	38	0
0,1		60	38	0

Tabelle 6: Einfluß von Natriumhypochlorit auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration	End- (ppm)	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
30		30		95
30	27	60	6	36
30		120		0
40		30		90
40	36	60	6	14
40		120		0
50		30		82
50	45	60	6	0
50		120		0
60		30		70
60	54	60	6	0
60		120		0

Tabelle 7: Einfluß von einem Jodophor (VR 2875-6) auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration	End- (%)	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
1		60		89
1	0,9	360	6	86
5		60		82
5	4,5	360	6	80
10		60		70
10	9,0	360	6	65

Tabelle 8: Einfluß von Ameisensäure auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration (g)	End- konzentration (g)	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (meq ml)	Restaktivität (%)
2,0	1,8	30	5	60
2,0		60		52
3,0	2,7	30	5	46
3,0		60	5	33
3,0		60	45	18
4,0	3,6	30	5	31
4,0		60	5	26
4,0		60	45	6
5,0	4,5	30	5	17
5,0		60	5	8
5,0		60	45	5

Tabelle 9: Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Salzsäure	pH	Mischung	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
0,1		0,1			19
0,2		0,3			21
0,3		0,4			39
0,4		0,5			39
0,5		0,6			42
0,6		0,7			44
0,7		0,8	60	7,5	48
0,8		0,9			53
0,9		1,0			55
1,0		1,1			58
2,0		4,2			78
2,5		4,9			84
3,0		5,5			92

Tabelle 10: Einfluß von quaternären Ammonium- bzw. Pyridiniumverbindungen auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration	End- konzentration (m)	Einwirkungszeit (min)	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
0,01		30		36
0,01	0,009 ⁺	60	6	36
0,01		120		28
0,01		30		44
0,01	0,009 ⁺⁺	60	5	42
0,05		30		44
0,05	0,045	60	5	42
0,1		30		25
0,1	0,09	60	5	23
0,01		30		46
0,01	0,009 ⁺⁺⁺	60	10	44
0,01		120		44

+) Alkylbenzyltrimethylammoniumchlorid; ++) Cetylpyridiniumchlorid; +++) Cetylammmoniumbromid

Tabelle 11: Einfluß von Amphotensiden auf die serologische Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat)

Anwendungs- konzentration	End- konzentration (%)	Einwirkungszeit	Enterotoxingehalt (mcg/ml)	Restaktivität (%)
0,5	0,45 ⁺	12 Std.	6,0	79
1,0	0,9			77
1,5	1,35			66
2,0	1,8			65
2,5	2,25			63
0,5	0,45 ⁺⁺	60 min	6,0	67
1,0	0,9			65
1,5	1,35			62
2,0	1,8			58
2,5	2,25			50
+) Tego 51				
++) Tego diocto				

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Staphylococcus aureus gehört neben Salmonellen und *Clostridium perfringens* zu den häufigsten bakteriellen Lebensmittelvergiftern. Ausgelöst werden die Staphylokokken-Lebensmittelvergiftungen durch von diesen Keimen gebildete Exotoxine, die aufgrund ihres Hauptangriffspunktes auch als Enterotoxine bezeichnet werden. Als Eiweiß ist Staphylokokkenenterotoxin in der Lage, im lebenden Organismus die Bildung spezifischer Antikörper anzuregen. Nachdem BERGDOLL, SURGALLA und DACK (1959) der Nachweis eines spezifischen präzipitierenden Antikörpers mit Enterotoxin-neutralisierenden Eigenschaften gelungen war, war die Basis für den in vitro-Nachweis von Staphylokokkenenterotoxin gegeben. In der Folgezeit nahm die Enterotoxinforschung (Untersuchungen zur Produktion und Reindarstellung von Enterotoxin, zur Struktur und zum Wirkungsmechanismus, zum Nachweis etc.) stetig an Bedeutung zu. In diesem Zusammenhang ist jedoch daran zu denken, daß von Staphylokokkenkulturen gebildetes Enterotoxin z.B. infolge von Laborunfällen oder sorglose Handhabung die Umgebung des Menschen kontaminieren und nach Trocknung als Aerosol eingeatmet werden kann (TERPLAN und ZAADHOF, 1974). Um die damit verbundenen Folgen für den Menschen möglichst weitgehend ausschalten zu können, wäre eine Dekontamination des Labors zum Zwecke der Enterotoxininaktivierung wünschenswert. Auch die z.B. nach der Produktion bzw. Reinigung der Enterotoxine in den gebrauchten Geräten und Gefäßen zurückbleibenden Reste sollten inaktiviert werden, um sicherzugehen, daß es nicht doch zu einer Intoxikation kommen kann. Bisher wurden noch keine ausführlichen Untersuchungen zu dieser Problemstellung durchgeführt.

Aufgabe dieser Arbeit war es, zu prüfen, ob und in welchem Umfang Mittel der chemischen Desinfektion und proteolytische Enzyme zur Inaktivierung von Staphylokokkenenterotoxin B geeignet sind.

Zu diesem Zweck wurde jedoch insbesondere im Hinblick auf die stärkere Stabilität ein Rohenterotoxin (Kulturfiltrat) und nicht ein gereinigtes Enterotoxin eingesetzt. Von den verschiedenen von EGGENSBERGER (1975) aufgezählten Verbindungsklassen,

die den handelsüblichen Desinfektionsmitteln zugrunde liegen (Alkalien - Schwermetalle - Peroxide - Halogene - Epoxide - Alkohole - Aldehyde - Carbonsäuren - Phenole - oberflächenaktive Verbindungen), wurden Schwermetalle und Epoxide aufgrund ihrer begrenzten praktischen Bedeutung nicht berücksichtigt. Zur Ermittlung des Enterotoxingehaltes vor und nach Zusatz der Desinfektionswirkstoffe bzw. proteolytischen Enzyme wurden der MANCINI-Test (MANCINI, CARBONARA und HEREMANS, 1965) und OUCHTERLONY-Test (SOMMERFELD und TERPLAN, 1975) durchgeführt. Auf biologische Verfahren wurde verzichtet, da sie mit Ausnahme des Affenfütterungstests und evtl. des Kätzchentests nicht zum spezifischen Enterotoxinnachweis geeignet sind. Außerdem besteht nach Ansicht von BERGDOLL (1969) zumeist eine enge Korrelation zwischen biologischer und serologischer Aktivität der Enterotoxine.

Bei Zusatz von n-Natronlauge war das Kulturfiltrat mit 7,5 mcg Enterotoxin/ml (pH 12,3) bereits nach 30 min bei 20 °C vollständig inaktiviert. Bei zehn- bzw. hundertfach schwächerer Konzentration der Natronlauge war innerhalb der erwähnten Zeitspanne der gleiche Effekt nur zu beobachten, wenn die Lauge bei 60 °C einwirkte, nicht aber bei 20 bzw. 40 °C. Auch die bakterizide Wirkung wird bei Temperaturerhöhung bis zu 40 °C nur unmerklich gesteigert (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967). Vermutlich beruht die detoxifizierende Wirkung der NaOH ebenso wie ihre bakterizide, fungizide und virusinaktivierende Wirkung auf dem Gehalt an OH-Ionen, die Säureamidbindungen hydrolytisch spalten können (EGGENSPERGER, 1975). Der pH-Wert der Lauge war dagegen offensichtlich von untergeordneter Bedeutung. Bei erheblich geringeren NaOH-Konzentrationen und infolge der stärkeren Dissoziation höheren pH-Werten wurden nämlich zum Teil noch erhebliche Restaktivitäten registriert, z.B. bei pH 12,8 eine Restaktivität von ca. 60 %. Die eigenen Ergebnisse deuten im übrigen darauf hin, daß ab pH 13 ein ausgeprägter direkter Effekt gegeben sein dürfte, da die Restaktivität in diesem Bereich - trotz sinkender NaOH-Konzentration - überproportional auf ca. 25 % abnahm. Zwar ist nach CHU (1968) die Antigen-Antikörper-Reaktion nach 5 min bei pH 13 vollständig aufgehoben, doch wurden die Versuche von ihm mit reinem Enterotoxin B und

nicht mit Rohenterotoxin durchgeführt. Es kann daher angenommen werden, daß die unterschiedlichen Ergebnisse insbesondere hierauf zurückzuführen sind.

Auch die Oxidationsmittel Peressigsäure (PES), Kaliumpermanganat (KMnO_4) bzw. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verminderten die serologische Aktivität des Rohenterotoxins beträchtlich. Dabei bestand allerdings ein erheblicher Unterschied zwischen PES und KMnO_4 einerseits und H_2O_2 andererseits. Bei letztgenanntem Desinfektionsmittel kam es nämlich nur zu einer ca. 50 %igen Inaktivierung, während PES und KMnO_4 unter geeigneten Bedingungen eine vollständige Inaktivierung bewirkten. So waren 5 mcg bzw. 30 mcg Enterotoxin/ml bei einer Endkonzentration von 0,27 % PES nach 30 bzw. 120 min nicht nachweisbar. Der gleiche Effekt war auch bei 0,09 m KMnO_4 zu verzeichnen gewesen. In der Literatur finden sich hinsichtlich des Einflusses von Oxidationsmitteln auf die serologische Aktivität von Enterotoxin B umfassende Angaben nur zum Einsatz von H_2O_2 (CHU und BERGDOLL, 1969). Dabei wurde festgestellt, daß 42 mcg gereinigtes und in 6 ml 0,3 m H_2O_2 (pH 2,3) gelöstes Enterotoxin B nach 12 Stunden bei 37 °C ca. 80 % der serologischen und 100 % der biologischen Aktivität verloren hatten. Die von CHU und BERGDOLL (1969) registrierte serologische Restaktivität war somit deutlich geringer als die im Rahmen der eigenen Versuche ermittelte. Die Unterschiede dürften in erster Linie auf die differierende Toxinbeschaffenheit (roh - gereinigt) und Inkubationsdauer (1 - 12 Stunden) zurückzuführen sein, kaum aber auf den unterschiedlichen pH-Wert (2,3 gegenüber 7,5 - 8,5), da CHU und BERGDOLL anhand einer Kontrolle beobachteten, daß die verminderte Antigen-Antikörper-Reaktion nicht Folge des niedrigen pH-Wertes war. Möglicherweise war auch die im Rohenterotoxin nachgewiesene Katalase für den verminderten inaktivierenden Effekt verantwortlich.

Von den geprüften Halogenverbindungen erwiesen sich Natriumhypochlorit, Calciumhypochlorit und Chloramin T ebenfalls als sehr gut zur vollständigen Inaktivierung von Rohenterotoxin B geeignet, während das Jodophorpräparat selbst in einer Konzentration von 9 % nur einen relativ geringen Effekt aufwies (Restaktivität nach 6 Stunden: 65 %). Erwartungsgemäß war die Reaktion auch bei

den Chlorverbindungen abhängig von der Konzentration des Enterotoxins, der Konzentration des aktiven Chlors und der Einwirkungszeit. Es ließ sich jedoch bereits mit 27 ppm aktivem Chlor bzw. 0,0009 m Chloramin T innerhalb von zwei Stunden ein vollständiges Ausbleiben der Antigen-Antikörper-Reaktion im OUCHTERLONY-Test und im MANCINI-Test erzielen. Auch TERPLAN und ZAADHOF (1974) sowie HINTERBERGER und MEYER (1975) hatten eine vollständige Inaktivierung von Enterotoxin B durch NaOCl beobachtet. Erstere gaben an, daß die serologische Aktivität von Enterotoxin B durch NaOCl (mit 0,5 % aktivem Chlor) vollständig zerstört wurde, letztere registrierten, daß nach einstündiger Einwirkung von 50 ppm freiem Chlor in alkalischer Phase auf 50 mcg Enterotoxin/ml Wasser keine Rückstände mehr im serologischen bzw. biologischen Test nachweisbar waren. Das unterschiedliche Inaktivierungsvermögen von Chlorverbindungen einerseits und dem Jodophorpräparat andererseits ist möglicherweise dadurch bedingt, daß die Wirkung der Chlorverbindungen auf dem oxidierenden Effekt - wie bei den Peroxiden - und der direkten Reaktion mit den Aminogruppen der Proteine beruht (EGGENSPERGER, 1975), Jod aber im Gegensatz zum Chlor nur indirekt mit den Proteinen reagiert (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967).

Während bei den bisher beschriebenen Desinfektionswirkstoffen unter geeigneten Bedingungen eine vollständige Inaktivierung des Rohenterotoxins B zustande kam - mit Ausnahme von H_2O_2 und dem Jodophorpräparat -, war die Wirkung der anderen geprüften Desinfektionsmittel (Ameisensäure, Milchsäure, Trichlorphenol, Alkylbenzyltrimethylammoniumchlorid, Cetyltrimethylammoniumbromid, Cetylpyridiniumchlorid, Tego 51, Tego diocto, Formaldehyd, Äthylalkohol, Isopropylalkohol) schon mehr oder weniger stark herabgesetzt. Mit den beiden Carbonsäuren wurden noch recht gute Inaktivierungsraten erzielt. Dabei war bei etwa gleicher Wasserstoffionenkonzentration (pH 3 - 4) die Ameisensäure (4,5 %) nach 60 min mit mehr als 90 %iger Verminderung der serologischen Aktivität effektiver als die Milchsäure (18 %) nach 30 bis 120 min mit ca. 80 %igem Aktivitätsverlust. Möglicherweise wäre es bei niedrigerem pH-Wert zu einer vollständigen Inaktivierung des Rohenterotoxins gekommen, zumal schwache bis mittelstarke Säuren auch nur

in undissoziiertem Zustand stark mikrobizid sind und der Dissoziationsgrad mit steigendem pH-Wert zunimmt. Bei der Ameisensäure beträgt z.B. der undissoziierte Anteil bei pH 2 fast 100 %, bei pH 3 noch 85 %, bei pH 4 aber nur 36,1 % (WALLHÄUSSER und SCHMIDT, 1967). Wenn im übrigen Salzsäure unterschiedlicher Wasserstoffionenkonzentration dem Kulturfiltrat zugesetzt wurde, war im erwähnten pH-Bereich der Mischungen Kulturfiltrat-Carbonsäure noch eine Restaktivität von ca. 70 % vorhanden. Erst ab einem pH-Wert von 0,3 war die Inaktivierungsrate mit ca. 80 % ungefähr so hoch wie bei den beiden organischen Säuren mit pH 3 bis pH 4. Infolgedessen kann auch davon ausgegangen werden, daß die Inaktivierung des Enterotoxins durch Ameisensäure und Milchsäure nur zum Teil pH-Wert-bedingt war. CHU (1968) berichtete zwar, daß die Antigen-Antikörper-Reaktion bei gereinigtem Enterotoxin bis pH 2,0 nicht deutlich verändert war, bei Werten von weniger als 1,5 aber innerhalb von 5 min zerstört wurde, doch waren keine näheren Angaben über die Art der verwendeten Säure zu finden. Daher ist auch ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen in den eigenen Versuchen nicht möglich.

Während von den kationenaktiven Verbindungen Alkylbenzyltrimethylammoniumchlorid (0,009 m) und Cetylpyridiniumchlorid (0,09 m) unter günstigen Bedingungen noch ca. 75 % des Rohenterotoxins innerhalb von 60 bis 120 min inaktiviert wurden, lag der vergleichbare Prozentsatz beim Cetylammoniumbromid (0,009 m) nur bei etwas mehr als 50 %. Diese Inaktivierungsrate war jedoch noch deutlich besser als jene der beiden zu den Amphotensiden gehörenden Desinfektionsmittel Tego 51 bzw. Tego diocto. Aus diesen Daten geht hervor, daß Rohenterotoxin B von oberflächenaktiven Verbindungen offensichtlich nur unvollständig zerstört wird. Entsprechendes trifft auch für das Trichlorphenol zu, welches die serologische Aktivität des Rohenterotoxins im Höchstfall um 55 % verminderte.

Mit den drei restlichen geprüften Desinfektionsmitteln Äthylalkohol (70 %), Isopropylalkohol (70 %) und Formaldehyd solutus wurde innerhalb des Beobachtungszeitraums keine Inaktivierung des Rohenterotoxins beobachtet. Diese Ergebnisse waren zumindest hinsichtlich des Alkohols zu erwarten gewesen, nachdem bereits DAVISON und DACK (1939) im Affenfütterungstest keine Toxizitätsabnahme

des mit Alkohol behandelten Kulturfiltrats registriert hatten, obwohl es zu einer alkoholbedingten Präzipitation gekommen waren. Die Alkoholpräzipitation wurde daher später auch von verschiedenen Autoren zur Reindarstellung von Enterotoxin B herangezogen (BERGDOLL et al., 1951; BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK, 1959; FREA, McCOY und STRONG, 1963 u.a.). Hinsichtlich der Antigen-Antikörper-Reaktion formaldehydbehandelten Enterotoxins B sind unterschiedliche Angaben in der Literatur zu finden. BERGDOLL (1966) hatte nämlich berichtet, daß bei Enterotoxoiden, die bei pH 8,0 mit 0,7 % Formalin hergestellt worden waren, die serologische Aktivität vollständig aufgehoben war, während SILVERMAN, ESPESETH und SCHANTZ (1969) bei den von ihnen bei pH 7,3 gewonnenen Enterotoxoiden nur eine geringfügige Abnahme der präzipitierenden Eigenschaften registrierten. Diese Abnahme war so gering, daß die Diffusionsrate bei der einfachen linearen Immunodiffusion nicht oder nur kaum verändert war - wenn auch die Banden häufig nur schwach ausgeprägt waren - und eine Koaleszenz mit nativem Referenztoxin im OUCHTERLONY-Test eindeutig gegeben war. SPERO, WARREN und METZGER (1973) versuchten dann diese Unterschiede damit zu erklären, daß die antigenen Determinanten des Enterotoxins bei pH 5 nur geringfügig, bei pH 7,5 bereits etwas stärker und bei pH 9,5 vollkommen zerstört würden. In den eigenen Versuchen wurde jedoch weder bei pH 6,0 noch bei pH 9,0 eine Veränderung hinsichtlich der Reaktionsfähigkeit der formalinbehandelten enterotoxinhaltigen Kulturfiltrate im MANCINI-Test bzw. OUCHTERLONY-Test festgestellt, wenn von der bereits von SILVERMAN, ESPESETH und SCHANTZ (1969) beschriebenen geringfügig herabgesetzten Intensität der Präzipitate abgesehen wird. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß einerseits bei den eigenen Versuchen das Formalin nur über 120 min bei 20 °C einwirkte und auch SILVERMAN, ESPESETH und SCHANTZ (1969) erst nach acht Stunden einen Verlust der präzipitierenden Aktivität registrierten, andererseits aber für die Enterotoxoidherstellung mindestens eine Woche bei 37 °C bzw. 24 Stunden bei 50 °C inkubiert wurde.

Da Staphylokokkenenterotoxine einfache niedermolekulare Proteine sind (BERGDOLL, 1970), wurde abschließend auch der Einfluß der proteolytischen Enzyme Pepsin und Trypsin geprüft. Es war jedoch

selbst nach sechsstündiger Einwirkungsdauer kein Hinweis darauf gegeben, daß die serologische Aktivität des Rohenterotoxins abgenommen hatte. Dies steht in Übereinstimmung mit den Angaben von BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK (1959) sowie SPERO, WARREN und METZGER (1973), die auch gereinigtes Enterotoxin nicht mit Trypsin inaktivieren konnten. Die umfassenden Untersuchungen der letztgenannten Autoren haben gezeigt, daß Trypsin zwar innerhalb von 30 min (pH 9,0) eine spezifische Peptidbindung des Enterotoxinmoleküls spaltet, dadurch aber die serologische und biologische Aktivität nicht verändert wird. Ähnliches dürfte auch für das Pepsin zutreffen. Zwar berichteten SCHANTZ et al. (1965) sowie BERGDOLL (1970) von einer inaktivierenden Wirkung des Pepsins bei pH-Werten von 2, doch wurde offensichtlich nicht der Frage nachgegangen, ob der Effekt tatsächlich dem Pepsin oder nicht vielmehr dem pH-Wert der Mischung zuzuschreiben ist. Auch Chymotrypsin, Rennin bzw. Papain waren nicht geeignet, die biologische Aktivität von gereinigtem Enterotoxin B zu zerstören (SCHANTZ et al., 1965). Für eine fehlende Wirksamkeit von Enzymen spricht weiterhin, daß nach BERGDOLL et al. (1965) die Behandlung mit den Carboxypeptidasen A und B ohne Effekt auf die serologische und biologische Aktivität von Enterotoxin B war.

Aus den eigenen Versuchen geht somit hervor, daß von den verschiedenen geprüften Desinfektionswirkstoffen PES und KMnO₄, die Chlorverbindungen NaOCl, Calciumhypochlorit und Chloramin T sowie Natronlauge in hoher Konzentration sehr gut geeignet sind, innerhalb angemessener Zeit Rohenterotoxin B bei Zimmertemperatur zu inaktivieren. Dabei hängt der inaktivierende Effekt von verschiedenen Faktoren ab. Zu berücksichtigen sind nicht nur die an Desinfektionsmittel selbst zu stellenden Anforderungen (z.B. hohe Belastbarkeit durch anorganische und organische Substanzen, geringe Toxizität, Geruchsarmut, gute Haut- und Materialverträglichkeit, Wirtschaftlichkeit), sondern auch der Einsatzbereich des Desinfektionsmittels (Geräte-, Raum-, Luft-, Händedesinfektion etc.) und Art des mit Enterotoxin kontaminierten Materials (z.B. Holz, Kunststoff, Glas, Stoff). Es sollte daher von Fall zu Fall entschieden werden, welchem der erwähnten vier Desinfektionsmittel der Vorzug gegeben wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurden der Einfluß verschiedener chemischer Desinfektionswirkstoffe aus der Gruppe der Alkalien, Peroxide, Halogene, Alkohole, Aldehyde, Carbonsäuren, Phenole und oberflächenaktiven Substanzen sowie der proteolytischen Enzyme Pepsin und Trypsin auf die Aktivität von Rohenterotoxin B (Kulturfiltrat) geprüft. Als Toxinnachweis wurden der OUCHTERLONY-Test und der MANCINI-Test angewandt.
2. Eine vollständige Inaktivierung unter den Prüfungsbedingungen wurde mit Peressigsäure, Kaliumpermanganat, den Chlorverbindungen und Natronlauge erzielt. Eine weitgehende Inaktivierung wurde mit Ameisensäure erreicht. Eine geringgradige Inaktivierung bewirkten Wasserstoffperoxid, Milchsäure, Trichlorphenol und alle Mittel aus der Gruppe der oberflächenaktiven Substanzen.
3. Keine Inaktivierung wurde mit Alkoholen, Formaldehyd und den proteolytischen Enzymen erreicht.
4. Der Effekt hing jeweils ab von der Konzentration der einzelnen Desinfektionswirkstoffe sowie von Einwirkungsdauer und Temperatur.
5. Bei Toxinträgerversuchen war eine vollständige Inaktivierung mit Peressigsäure und den Chlorverbindungen ebenfalls möglich.
6. Zur praktischen Anwendung werden im allgemeinen Chlorverbindungen, Peressigsäure, Kaliumpermanganat sowie Natronlauge vorgeschlagen, wobei die Wahl des einzelnen Mittels von den gegebenen Umständen abhängt.

SUMMARY

1. The influence of different chemical disinfectants belonging to the group of alkalis, peroxides, halogens, alcohols, aldehydes, carboxylic acids, phenols and surface active compounds and of the proteolytic enzymes pepsin and trypsin on the activity of crude staphylococcal enterotoxin B (culture filtrate) was tested. The OUCHTERLONY-test and MANCINI-test were applied for the detection of enterotoxin.
2. A complete inactivation was obtained under test conditions with peracetic acid, potassium permanganate, chlorine compounds, and soda lye. An extensive inactivation was effected by formic acid. A small inactivation was obtained with hydrogen peroxide, lactic acid, tri-chlorophenol and all surface active compounds.
3. No inactivation was observed with alcohols, formaldehyde, and the proteolytic enzymes.
4. The effect was dependent on the concentration of the disinfectant, the period of reaction, and the temperature.
5. In tests with toxin carriers a complete inactivation was caused by peracetic acid and by the chlorine compounds, too.
6. Chlorine compounds, peracetic acid, potassium permanganate and soda lye are recommended for practical use. The choice of the particular disinfectant depends on given circumstances.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ANGELOTTI, R. (1969):

Staphylococcal intoxications.

in: RIEMANN, H. (1969): Food borne infections and intoxications.
Academic Press, New York und London, 359 - 393

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physico-chemical properties of enterotoxin
C, Staphylococcus aureus strain 361.

Biochemistry 6 , 1474 - 1480

BAUMGART, J. (1970):

Konservierung von Bakterien durch Trocknen an Porzellanbruch-
stücke .

Die Fleischwirtschaft 50, 966

BERGDOLL, M.S. (1966):

Immunization of rhesus monkeys with enterotoxoid B.

J. Infect. Dis. 116, 191 - 196

DERSELBE (1969):

Bacterial toxins in food.

Food Technol. 23, 530 - 533

DERSELBE (1970):

Enterotoxins.

in: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL (1970): Microbial
toxins. Bd. 3.

Academic Press, New York und London, 265 - 326

DERSELBE (1972):

The enterotoxins.

in: COHEN, J.O. (1972): The Staphylococci.

Wiley-Interscience, New York, London Sydney, Toronto 301 - 331

DERSELBE (1954):

Staphylococcus enterotoxin.

Proceedings of the sixth Research Conference.

BERGDOLL, M.S., J.L. KADAVY, M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1951):

Partial purification of staphylococcal enterotoxin.

Arch. Biochem. Biophys. 33, 259 - 261

BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA und G.M. DACK (1959):

Staphylococcal enterotoxin. I. Purification.

Arch. Biochem. Biophys. 85, 62 - 69

BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959):

Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property.

J. Immunol. 83, 334 - 338

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481 - 1485

BERGDOLL, M.S., F.S. CHU, I.-Y. HUANG, C. ROWE und T. SHIH (1965):

Staphylococcal enterotoxin B.

III. The physicochemical properties and the N- and C-terminal amino acid sequences.

Arch. Biochem. Biophys. 112, 104 - 110

BERGDOLL, M.S., I.-Y. HUANG, S. CHU und C. BORJA (1969):

The chemistry of bacterial toxins: The staphylococcal enterotoxins.

J. South African Chem. Inst. 22, 99 - 105

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):

Identification of enterotoxin E.

Inf. and Immunity 4, 593 - 595

BERGDOLL, M.S. und R.N. ROBBINS (1973):

Characterization of types of staphylococcal enterotoxins.

J. Milk and Food Technol. 36, 610 - 612

BERGDOLL, M.S., R.N. ROBBINS, K.F. WEISS, C.R. BORJA, I.-Y.
HUANG und F.S. CHU (1973):

The staphylococcal enterotoxins: similarities.
Contributions to microbial and immunology. Vol. 1,
Staphylococci and staphylococcal infections.
Karger, Basel 390 - 396

BERGDOLL, M.S., I.-Y. HUANG und E.J. SCHANTZ (1974):
Chemistry of the staphylococcal enterotoxins.
J. Agr. Food Chem. 22, 9 - 13

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):
Purification and partial characterization of enterotoxin C
produced by *Staphylococcus aureus* strain 137.
Biochemistry 6, 1467 - 1473

BORJA, C.R., E. FANNING, I.-Y. HUANG und M.S. BERGDOLL (1972):
Purification and some physicochemical properties of staphylo-
coccal enterotoxin E.
J. Biol. Chem. 247, 2456 - 2463

CASMAN, E.P. (1960):
Further serologic studies on staphylococcal enterotoxin.
J. Bact. 79, 849 - 856

CASMAN, E.P., M.S. BERGDOLL und J. ROBINSON (1963):
Designation of staphylococcal enterotoxins.
J. Bact. 85, 715 - 716

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):
Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.

J. Bact. 94, 1875 - 1882

CHU, F.S. (1968):

Hydrogen ion equilibria of staphylococcal enterotoxin B.

J. Biol. Chem. 243, 4342 - 4349

CHU, F.S. und M.S. BERGDOLL (1969):

Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B.

1. Alkylation and oxidation of methionine residues.

Biochim. Biophys. Acta 194, 279 - 286

CHU, F.S. und E. CRARY (1969):

Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B.

2. Carboxyl residues.

Biochim. Biophys. Acta 194, 287 - 292

CHU, F.S., E. CRARY und M.S. BERGDOLL (1969):

Chemical modification of amino groups in staphylococcal enterotoxin D.

Biochemistry 8, 2890 - 2896

DACK, G.M. (1952):

Food poisoning. 2. Aufl.

University of Chicago Press, 80 - 118

DALIDOWICZ, J.E., S.J. SILVERMAN, E.J. SCHANTZ, D. STEFANYE und L. SPERO (1966):

Chemical and biological properties of reduced and alkylated staphylococcal enterotoxin B.

Biochemistry 5, 2375 - 2381

DAVISON, E. (1940):

Dissertation Chicago.

Zit. nach DACK, G.M. (1952)

DAVISON, E. und G.M. DACK (1939):

Some chemical and physical studies of Staphylococcus enterotoxin.

J. Infect. Dis. 64, 302 - 306

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE - DGHM - (1969):

Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

DOLMAN, C.E. und R.J. WILSON (1938):

Experiments with staphylococcal enterotoxin.

J. Immunol. 35, 13 - 30

EGGENSPERGER, H. (1975):

Desinfektionswirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen.

Hospital-Hygiene, Gesundheitswesen und Desinfektion 67, 321 - 329

FREA, J.I., E. McCOY und F.M. STRONG (1963):

Purification of type B staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 86, 1308 - 1313

GREENSPAN, F.P. und D.G. MAC KELLAR (1951):

The application of peracetic acid germicidal washes to mold control of tomatoes.

Food Technol. 5, 95 - 97

HAMMON, W.Mc.D. (1941):

Staphylococcal enterotoxin: an improved cat test, chemical and immunological studies.

Amer. J. Publ. Health 31, 1191 - 1198

HIBNICK, H.E. und M.S. BERGDOLL (1959):

Staphylococcal enterotoxin. II. Chemistry.

Arch. Biochem. Biophys. 85, 70 - 73

HINTERBERGER, J. und G. MEYER (1975):

Persönliche Mitteilungen.

HOPPER, S.H. und D.G. DEVALOIS (1961):

Modification of staphylococcal enterotoxin with beta propiolactone.

Bact. Proc., 109

HUANG, I.-Y., T. SHIH, C.R. BORJA, R.M. AVENA und M.S. BERGDOLL

(1967):

Amino acid composition and terminal amino acids of staphylococcal enterotoxin C.

Biochemistry 6, 1480 - 1484

HUANG, I.-Y., E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1969):

The preparation and enzymatic digestion of oxidized, reduced and alkylated enterotoxin B.

Arch. Biochem. Biophys. 132, 423 - 429

DIESELBEN (1975):

The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins.

Jap. J. Med. S. 28, 73 - 75

HUANG, I.-Y. und M.S. BERGDOLL (1970):

The primary structure of staphylococcal enterotoxin B.

I. Isolation, composition, and sequence of tryptic peptides from oxidized enterotoxin B.

J. Biol. Chem. 245, 3493 - 3510

DIESELBEN (1970):

The primary structure of staphylococcal enterotoxin B.

II. Isolation, composition, and sequence of chymotryptic peptides from oxidized enterotoxin B.

J. Biol. Chem. 245, 3511 - 3517

HUTCHINGS, I.J. und H. XEZONES (1949):

zit. nach TICHACEK, B. (1972)

Bact. Proc. (1949), 50 - 51

JORDAN, E.O., G.M. DACK und O. WOOLPERT (1931):

zit. nach DACK, G.M. (1952)

J. Prevent. Med. 5, 383 - 386

KOCH, H.R., M. SPRÖSSIG und H. MÜCKE (1967):

Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure.

4. Mitteilung: Untersuchungen zur fungiziden Wirkung.

Die Pharmazie 22, 520 - 521

LOCHER, E. (1976):

Persönliche Mitteilungen.

MANCINI, G., A.O. CARBONARA und J.F. HEREMANS (1965):

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.

Immunochem. 2, 235 - 254

MINETT, F.C. (1938):

Experiments on Staphylococcus food poisoning.

J. Hyg. 38, 623 - 637

MÜCKE, H. und M. SPRÖSSIG (1967):

Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure. 1. Mitteilung:

Herstellung, Gehaltsbestimmung und Eigenschaften der Peressigsäure.

Die Pharmazie 8, 444 - 445

DIESELBEN (1967):

Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure.

2. Mitteilung: Untersuchungen zur Stabilität der Peressigsäure.

Die Pharmazie 8, 445 - 447

OUCHTERLONY, Ö. (1948):

Antigen-antibody reactions in gels.

Arkiv. kemi. Min. och Geol. 26 B, 1 - 9

Zit. nach CASMAN, E.P. (1958)

RAJ, H.D. und M.S. BERGDOLL (1969):

Effect of enterotoxin B on human volunteers.

J. Bact. 98, 833 - 834

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO, D.A. DUNNERY
und M.S. BERGDOLL (1965):

Purification of staphylococcal enterotoxin B.

Biochemistry 4, 1011 - 1016

SCHORMÜLLER, J. (1970):

Handbuch der Lebensmittelchemie. Band IX,

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

SIEVERT, R. und K. WEGNER (1972):

Zum Wirkungsspektrum von chemischen Desinfektionsmitteln.

Die Lebensmittel-Industrie 19, 97 - 100

zit. nach KLEINSCHMIDT, (1973)

SIMON, E. (1976):

Persönliche Mitteilungen.

SILVERMAN, S.J., D.A. ESPESETH und E.J. SCHANTZ (1969):

Effect of formaldehyde on the immunochemical and biological
activity of staphylococcal endotoxin B.

J. Bact. 98, 437 - 442

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137

SPERO, L., H.M. JACOBY, J.E. DALIDOWITZ und S.J. SILVERMAN (1971):
Guanidination and nitroguanidiantion of staphylococcal enterotoxin B.

Biochim. Biophys. Acta 251, 345 - 354

SPERO, L., J.R. WARREN und J.F. METZGER (1973):

Effect of single peptide bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin B.

J. Biol. Chem. 248, 7289 - 7294

SPERO, L., D.L. LEATHERMAN und W.H. ADLER (1975):

Mitogenicity of formalinized toxoids of staphylococcal enterotoxin B.

Inf. Immunol. 12, 1018 - 1020

SPICHER, G. (1970):

Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren, die ihre Wirksamkeit und Brauchbarkeit beeinflussen.

Path. Mikrobiol. 36, 259 - 276

SPRÖSSIG, M. (1973):

Kaltsterilisation mit Peressigsäure.

Mitteil. der Österr. Sanitätsverwaltung 74, 1 - 3 (Sonderdruck)

SPRÖSSIG, M., H. MÜCKE und Ch. TILGNER-PETER (1967):

Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure.

3. Mitteilung: Untersuchungen zur bakteriziden und sporiziden Wirkung.

Die Pharmazie 22, 517 - 519

SPRÖSSIG, M. und H. MÜCKE (1967):

Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure.

5. Mitteilung: Untersuchungen zur viruziden Wirkung.

Die Pharmazie 23, 665 - 667

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch -
eine kurze Übersicht.

Milchwiss. 22, 761 - 771

DIESELBEN (1974):

Detoxifizierung von Toxinen mikrobiellen Ursprungs.

Forschungsbericht aus der Wehrmedizin 74-4

THATCHER, F.S. und B.H. MATHESON (1955):

Studies with staphylococcal toxins. II. The specificity of
enterotoxin.

Can. J. Microbiol. 1, 382 - 400

TICHACEK, B. (1972):

Peressigsäure.

in: WEUFFEN, W. (Hrsg.) (1972), Bd. I: Grundlagen der
Desinfektion.

VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 162 - 175

TRAUTWEIN, K. und G. KRÜGER (1977):

Desinfektion in der Veterinärhygiene - Theorie und Praxis.

Tierärztl. Umschau 32, 3 - 12, 60 - 74, 124 - 132, 185 - 200

WALLHÄUSSER, K.H. und H. SCHMIDT (1967):

Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie.

Verlag Georg Thieme, Stuttgart

WARREN, J.R., L. SPERO und J.F. METZGER (1973):

Antigenicity of formaldehyde-inactivated staphylococcal entero-
toxin B.

J. Immunol. 111, 885 - 892

WILLINGER, H. (1972):

Desinfektion.

in: HARTWIGK, H. und D. STRAUCH (1972): Veterinärhygiene.

2. Aufl.

Paul Parey, Berlin und Hamburg 206 - 225

Abschließend möchte ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Anfertigung meiner Arbeit danken.

Besonders herzlich danke ich auch Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für seine stete Hilfsbereitschaft und Beratung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihr freundliches Entgegenkommen bedanken.

L e b e n s l a u f

Am 3. November 1950 wurde ich als Sohn des Lehrers Johannes Helber und seiner Ehefrau Erika, geb. Koberg in Schorndorf, Kreis Waiblingen, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule trat ich im Frühjahr 1960 in das Gymnasium in Schorndorf ein und legte dort im Sommer 1969 die Reifeprüfung ab.

Danach leistete ich 15 Monate meinen Wehrdienst ab.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin. Nach dem Physikum setzte ich im Wintersemester 1972/73 das Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München fort, das ich im November 1975 mit dem Staatsexamen und im Januar 1976 mit der Bestallung zum Tierarzt ab schließen konnte.

